

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2019

Barbora Havlíčková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM ANTIOXIDATIVNÍHO POTENCIÁLU VÝLISKŮ
VYBRANÉHO OVOCE**

STUDY OF THE ANTIOXIDATIVE POTENTIAL OF SELECTED FRUIT MARCS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Havlíčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1421/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Barbora Havlíčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium antioxidantního potenciálu výlisků vybraného ovoce

Zadání bakalářské práce:

Literární část:

- 1) Botanická charakteristika aronie (*Aronia melanocarpa*) a hroznového vína (*Vitis vinifera*) a hlavní účinné látky v nich obsažené
- 2) Celková antioxidační aktivita a postupy jejího stanovení
- 3) Ovocné výlisky jako surovina pro další zpracování

Experimentální část:

- 1) Stanovení obsahu vody ve výliscích sušených do konstantní hmotnosti při 40°C
- 2) Extrakce výlisků a mletých výlisků
- 3) Stanovení celkových fenolických látek v připravených extraktech
- 4) Stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů
- 5) Zpracování získaných dat a jejich vyhodnocení

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Barbora Havlíčková

student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

ABSTRAKT

Tématem této bakalářské práce byla antioxidační aktivita vybraného druhu ovoce. Mezi vybrané druhy patřily matoliny z červeného a bílého hroznového vína, výlisky z černého bezu a aronie. Rovněž byly analýze podrobeny dva druhy vyrobených kapslí z výlisků bílého hroznů a aronie. Výsledky této bakalářské práce jsou shrnuty do čtyř kapitol. V první kapitole jsou porovnány obsahy vody při sušení 40 °C a 105 °C. Ve druhé jsou diskutovány výsledky extrakce v různých poměrech směsi rozpouštědel voda – ethanol a výsledky extrakce v připravené umělé žaludeční šťávě. Ve výsledku byla směs ethanol – voda účinnější rozpouštědlo než umělá žaludeční šťáva. Třetí kapitola se zabývá výsledky a diskuzím stanovení celkového obsahu fenolických látek. V případě směsi rozpouštědel bylo největší množství polyfenolů v matolinách červené révy stanovené na $43,56 \pm 1,23 \text{ mg.g}^{-1}$, oproti tomu v žaludeční šťávě největší obsah byl v bezinkách stanoven na $11,89 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$. V žaludeční šťávě byly extrahovány i kapsle, u aróniových kapslí byl zjištěn obsah $2,53 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$, zatímco u kapslí z matolin bílého hroznů $5,93 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$. V poslední kapitole jsou srovnány výsledky měření TAA pomocí metody TEAC a EPR. Metoda EPR byla vhodnější pro hodně zředěné roztoky než metoda TEAC. Výsledky této práce dokazují, že ve výliscích je velké množství polyfenolů a jiných antioxidantů, které ovlivňují celkovou antioxidační aktivitu. Výlisky mají velký potenciál využití jako přírodní barviva nebo se mohou využít k výrobě doplňku stravy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aronie, vinná réva, výlisky, antioxidační aktivita, polyfenoly, TEAC, EPR

ABSTRACT

Subject of this bachelor thesis was antioxidant activity of selected kind of fruits. Among selected kinds were the marc of red and white grapes, moldings from red elderberry and aronia. Two species of made capsules from marcs of white grapes and aronia were also subjected to analysis. Results of this bachelor thesis are summarized to four chapters. The first chapter compares the water content of drying at 40 ° C and 105 ° C. In the second chapter, the results of extraction in different proportions of solvent mixture ethanol - water and results of extraction in prepared artificial gastric juice are discussed. As a result, the water – ethanol mixture was a more effective solvent than artificial gastric juice. The third chapter deals with the results and discussion of the determination of the total content of phenolic substances. For the solvent mixture, the largest amount of polyphenols in the red vine marc was determined to be 43,56 mg.g⁻¹, while in gastric juice the largest content in the elderberry was determined to be 11,89 mg.g⁻¹. Capsules were also extracted in gastric juice, and 2,53 mg.g⁻¹ was found in aronia tablets, while 5,93 mg.g⁻¹ in white grape tablets. The last chapter compares the results of TAA measurements using the TEAC and EPR methods. The EPR method was more suitable for much diluted solutions than the TEAC method. The results of this work show that there is a large number of polyphenols and other antioxidants in the moldings that affect the overall antioxidant activity. Marcs have great potential for use as natural dyes or can be used to make a food supplement.

KEYWORDS

Aronia, grapevine, marcs, antioxidation activity, polyphenolic compounds, TEAC, EPR

HAVLÍČKOVÁ, Barbora. *Studium antioxidantního potenciálu výlisků vybraného ovoce* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-31]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113370>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat zejména paní RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za odborné vedení práce, dále panu Ing. Jakubu Křikalovi, za cenné rady k prováděným experimentům a v neposlední řadě panu Lubomíru Janhubovi za poskytnutí vzorků aronie a tabletek.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Botanická charakteristika aronie (<i>Aronia melanocarpa</i>)	9
2.1.1 Taxonomie	10
2.2 Botanická charakteristika hroznového vína (<i>Vitis vinifera</i>)	10
2.2.1 Taxonomie	14
2.3 Hlavní účinné látky obou studovaných rostlin	14
2.3.1 Minerální látky a vitamíny	14
2.3.2 Vlákna	14
2.3.3 Polyfenolické sloučeniny	15
2.4 Celková antioxidační aktivita a postupy jejího stanovení	19
2.4.1 Antioxidanty	19
2.4.2 Volné radikály	20
2.4.3 Celková antioxidační aktivita	20
2.4.4 Metody stanovení	21
2.5 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)	24
2.6 Ovocné výlisky jako surovina pro další zpracování	25
2.6.1 Vinné matoliny	25
2.6.2 Aroniové výlisky	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií	26
3.1.1 Přístroje	26
3.1.2 Pracovní pomůcky	26
3.1.3 Chemikálie	26
3.1.4 Příprava roztoků	26
3.2 Analyzované vzorky	27
3.3 Stanovení obsahu vody ve výliscích sušených do konstantní hmotnosti při 40 °C a při 105 °C	28
3.4 Extrakce výlisků a mletých výlisků	28
3.4.1 Extrakce ethanolu v ethanolu a ve vodě	28
3.4.2 Extrakce v uměle vytvořené žaludeční šťávě	29
3.5 Stanovení celkových fenolických látek v připravených extraktech	29

3.6	Stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů	30
3.6.1	Technika EPR	30
3.6.2	Spektrofotometrické stanovení pomocí ABTS•+	30
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	Stanovení obsahu vody ve výliscích sušených do konstantní hmotnosti při 40 °C a při 105 °C	31
4.2	Extrakce výlisků a mletých výlisků.....	32
4.2.1	Extrakce bezových výlisků ve vodě, ethanolu a jejich směsích	32
4.2.2	Extrakce v simulované žaludeční šťávě.....	33
4.3	Stanovení celkových fenolických látek v připravených extraktech	35
4.3.1	Stanovení po extrakci směsí voda-ethanol.....	35
4.3.2	Stanovení po extrakci syntetickou žaludeční šťávou.....	36
4.4	Stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů instrumentálními technikami.....	37
4.4.1	Sestrojení kalibrační závislosti Troloxu.....	37
4.4.2	Stanovení celkové antioxidační aktivity metodou EPR.....	38
4.4.3	Spektrofotometricky pomocí radikálu ABTS•+	39
5.	ZÁVĚR	41
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42
7.	SEZNAM ZKRATEK	47
8.	PŘÍLOHY	48

1. ÚVOD

Lidský organismus je často vystaven působení extrémně reaktivních molekul, které se nazývají volné radikály. Ty jsou vedlejšími produkty metabolismu buněk (např. kyslíkové radikály jakožto součásti aerobního metabolismu), anebo exogenní sloučeniny pocházející ze životního prostředí či stravy. Jestliže tělo nemůže účinně zpracovat a odstranit volné radikály, může dojít k oxidačnímu nebo jinému stresu a tím ke vzniku onemocnění (např. zánětu, rakoviny). Velký vliv na tvorbu radikálů má také kouření, UV záření a stres obecně.

Antioxidační ochranný systém člověka představuje velmi složitý komplex mechanismů. Před několika miliardami let vznikl tento systém jako důsledek vzestupu koncentrace kyslíku v atmosféře zapříčiněný fotosyntetickou aktivitou sinic. Organismus používá tři druhy ochrany – prevenci, záchyt a likvidaci. Cílem prevence je to, aby volné radikály nevznikaly, čehož lze dosáhnout regulací aktivity enzymů. Rovněž pozitivní vliv na prevenci má pravidelná fyzická aktivita a vyvážená strava. Příznivý vliv na lidské zdraví má konzumace ovoce a zeleniny, pravděpodobně z důvodu vysokého obsahu fenolických sloučenin. Další možnost ochrany je záchyt, kdy dochází k vychytávání již vzniklých radikálů speciálními sloučeninami. Posledním způsobem je likvidace, kdy organismus odstraňuje již poškozené biomolekuly (např. fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů).

Látky, které brání náš organismus před radikály se nazývají antioxidanty. Mezi nejvýznamnější antioxidanty patří vitamíny (např. vitamín C, E, β -karoten) a hlavně polyfenoly. Organismus si některé antioxidanty produkuje sám, ale většinou je potřeba je přijímat v potravě, ať už jako doplňky stravy nebo formou pestré přírodní stravy.

Polyfenoly (fenolické sloučeniny) jsou sekundárními metabolity rostlin. Ty si je produkují během svého vývoje jako odezvu na infekci, poranění, stresové faktory z okolí nebo na působení UV záření. Polyfenoly se vyskytují v rostlinách na úrovni pletiv a rozdělují se na rozpustné a nerozpustné. Rozpustné polyfenoly, začleněné ve vakuolách a plastidech, patří do skupiny pigmentů a chrání před UV zářením. Nerozpustné polyfenoly, převážně ligniny, tvoří buněčnou stěnu a mechanickou oporu rostlinné hmoty.

Největší množství polyfenolů v ovoci se nachází ve slupkách a semenech. Proto jsou ovocné výlisky bohaté na tyto významné antioxidační látky a mohou se využít například pro výrobu doplňků stravy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Na ovocné výlisky se často nahlíží jako na odpad ze zpracování ovoce a většinou se jenom kompostují. Tím se ztrácí mnoho biologicky aktivních látek, např. antioxidantů, které by mohly být využity k podpoře lidského zdraví. Pro studium antioxidačního potenciálu výlisků byly vybrány výlisky z aronie a z vinné révy, u kterých se předpokládá značný obsah těchto antioxidačních sloučenin.

2.1 Botanická charakteristika aronie (*Aronia melanocarpa*)

Aronia je rod opadavých keřů nebo nízkých stromků, které patří do čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Plody aronie mají kyselou, trpkou a svíravou chuť z důvodu vysokého obsahu tříslovin. Aronie pochází ze Severní Ameriky, kde z ní domorodci připravovali extrakt proti nachlazení a nutričně bohatý pokrm, nazývaný pemikan. Do Evropy se dostala až na přelomu 19. a 20. století [1,2,3].

Nejznámější jsou tři druhy: *Aronia melanocarpa* (temnoplodec černoplodý), též černý jeřáb nebo černá jeřabina, v angličtině „chokeberry“. *Aronia arbutifolia* (temnoplodec planikolistý) a *Aronia prunifolia* (temnoplodec třešňolistý). Tyto druhy se odlišují od sebe barvou a velikostí plodu a dobou sklizně. Malvice druhu *Aronia arbutifolia* mají červenou barvu, *Aronie prunifolia* fialovou barvu a největší malvici, tmavě modré až černé barvy, má *Aronia melanocarpa* [1,2,3].

Keř je odolný vůči nízkým teplotám, které dosahují až -40 °C. Výška keře se pohybuje okolo 2–3 m, široký je asi 1,5 m [1,2,3].

Tato dřevina se pěstuje jako okrasný keř a má také komerční využití. Je nenáročná na půdu, je odolná vůči škůdcům, ale na druhou stranu má velké nároky na světlo. Jeden keř produkuje až 10 kg ovoce. Plody se běžně používají k výrobě ovocného sirupu, ovocné šťávy, pomazánek, ovocných želé a čaje [2,3].



Obrázek 1 *Aronia melanocarpa* [4]

Listy

Tmavě zelené listy, oválného až eliptického tvaru mají délku 2 – 6 cm. Jsou jednoduché, střídavé a na zimu opadavé. Na podzim mají červenou až hnědou barvu [2,5].

Květy

Keř aronie mívá bílé květy od dubna do června. Květy jsou malé o průměru 1,5 cm, bílé a uspořádány v chocholičnatých květenstvích [4,5].

Plody

Plodem je červená až purpurově černá malvice o průměru 6 – 13 mm a hmotnosti 0,5 – 2 g. Plody aronie mají sladkou až trpkou chuť a vzhledem se podobají plodům černého rybízu. Ke sklizni plodů je nejvhodnější přelom srpna a září [2,3,5].

2.1.1 Taxonomie [6]

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	vyšší rostliny (<i>Cormobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	růžotvaré (<i>Rosales</i>)
Čeleď:	růžovité (<i>Rosaceae</i>)
Rod:	<i>Aronia</i>
Druh:	<i>Aronia melanocarpa</i>

2.2 Botanická charakteristika hroznového vína (*Vitis vinifera*)

Vinná réva je jednou z nejvýznamnějších ovocných plodin na světě, s produkcí vyšší než 74 milionů tun ročně. Z této produkce většina (80,0 %) připadá na výrobu vína, zbývající část je využívána ke konzumaci čerstvých plodů nebo k výrobě šťáv. Réva vinná se pěstuje ve vinicích nebo vinohradech [7,8].

Vitis vinifera L se zařazuje do čeledě *Vitaceae* a dělí se na dva poddruhy. Prvním je *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* (nebo *sativa*) označovaná také jako „evropská réva vinná“. Druhým poddruhem je lesní réva – *Vitis vinifera* subsp. *silvestris* (nebo *sylvestris*). Tyto poddruhy se liší morfologickými znaky, jejichž porovnání je zaznamenáno do Tabulky 1 [9].

Réva vinná je popínavá dřevnatá liána, která dosahuje ve volné přírodě výšky až 30 m, s průměrem až 1,5 m. Šlechtěná vína mívají na vinicích maximální výšku 4 m a průměr do 50 cm [10].

Vinná réva pochází ze střední Asie, z Kavkazu a z oblasti Černého a Kaspického moře. Podle výzkumů bylo víno známé v Egyptě už 3 200 let před našim letopočtem. Na naše území se pěstování vinné révy rozšířilo za vlády římského císaře Marca Aurelia Probusa, který nechal vinici vysadit na jižní Moravě [11].

Při výběru místa pro pěstování je velmi důležité vzít v úvahu klimatické faktory, topografické faktory a půdní podmínky. Mezi topografické faktory patří expozice ke světovým stranám, sklon svahu, umístění na svahu, nadmořská výška. Nejvhodnější jsou střední oblasti svahu. Půdní druh, půdní typ, vododržnost půdy a hospodaření s vodou, záhřevnost půdy spadají mezi půdní faktory. Pro vztah mezi révou a půdou jsou velmi důležité vlastnosti půdy, texturní složení, obsah živin, obsah organických látek, dostupnost a pH. Mezi klimatické faktory se řadí přímé sluneční záření, teplota, vodní bilance, proudění chladných větrů. Révu vinnou je možné pěstovat od tropických oblastí do oblastí mírného pásu, kam spadá i Česká republika. Optimální teplota by se měla pohybovat okolo 11 až 16 °C. Minimální doba svitu by měla být 1 100 – 1 600 hodin za vegetační období (1.duben – 31.říjen) [12].



Obrázek 2 *Hroznové víno* [13]

Kořenový systém

Kořenový systém je vegetativní orgán, který zabezpečuje důležité funkce, jako jsou upevnění a ukotvení révy v půdě, ukládání zásobních látek, příjem vody a živin z půdy a také tvorba rostlinných hormonů. Kořeny mohou prorůst až do hloubky několika metrů, mnohokrát se dostávají až na matečnou horninu, tudíž se předpokládá, že kořeny ovlivňují mineralitu vína. V praxi se k rozmnožování révy používá roubování. Kořenový systém vzniká z podnožového řízku, který tvoří kořenový kmen a na něm se vytvoří hlavní, vedlejší a povrchové kořeny. Nejvýznamnější jsou vedlejší kořeny, které složí k příjmu vody a živin půdy [8,9].

Listy a zálisky

Listy mají většinou 3–5 laloků, zřídka 7. Listová čepel révy bývá velká, na okraji zoubkovaná, většinou laločnatá. Listovou čepel tvoří pět hlavních žilek rozvětvených v hustou síť nervů. V listech vznikají cukry v rámci fotosyntézy. Zdravá listová plocha je základem pro kvalitní cukernatost hroznů [9,14].

Zálisky, taktéž označovány jako fazochy, vyrůstají v paždí listů ze záliskových oček. Na záliscích mohou vznikat záliskové hrozny, tzv. „martiňáky“. Ty se musí, co nejdříve odstranit, jelikož by docházelo ke zhoršování kvality hlavních hroznů. Listy a zálisky bývají napadány houbovými chorobami, které mohou negativně ovlivňovat například přezimování keřů [9,14].

Květy a květenství

Květy révy vinné jsou malé, zelené a pětičetné s květním vzorcem $\text{Ca (5), Co (5), A 5, G (2)}$. Většina pěstovaných odrůd má květy oboupohlavné a samosprašné, zatímco divoké druhy mají květy samčí a samičí [9].

Květenství révy se nazývá lata. Velikost a délka květenství bývá závislá na odrůdě, například u moštových odrůd jsou květenství kratší, u stolních dlouhá (25 cm) nebo i velmi dlouhá (30 – 40 cm). Hlavním zdrojem pro vývoj květů a bobulí jsou cukry. Při teplotách vzduchu 25 – 35 °C dochází k nejintenzivnějšímu kvetení [9].

Negativní vliv na kvetení má deštivé počasí, jelikož vytrvalý déšť a teploty pod 15 °C způsobují smývání pylu, tím zhoršují otevírání květů, a tím také opylení a oplození. Na druhou stranu při extrémním suchu, větrném počasí blízka naopak osychá a opylení se rovněž zhoršuje [9].

Hrozen

Souplodí, tedy hrozen je složený z bobulí a vzniká z květenství. Hrozen se skládá ze stopky, třapiny a bobulí, tím si zachovává základní morfologické vlastnosti květenství. Rozměr hroznů je závislý na ekologických podmínkách a na odrůdě [8,9].

Třapina vzniká změnou osy květenství. Z celkové hmotnosti hroznu představuje 3 – 7 %. Třapina má vysoký obsah fenolických látek, který tvoří asi 20 % obsahu fenolických látek v hroznu [8,9].

Plody

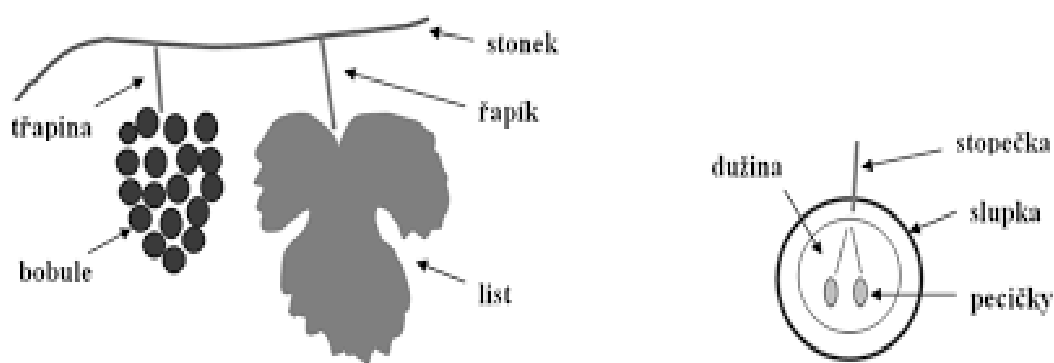
Dužnatým plodem révy vinné je bobule. Bobule je k třapině upevňována stopkami. Bobule je složena z perikarpu (oplodí), který se rozděluje na exokarp (slupku), mezokarp (dužninu) a endokarp (pletivo ohraničující semena) [9].

Slupka bobule je tvořena kutikulou, epidermis a hypodermis. Slupka obsahuje především kyselinu citronovou, fenolické látky-anthokyanová barviva, taniny a vonné látky. Ve slupce bývá hodnota pH vyšší než v dužnině [9].

Dužnina je tvořena velkými mnohoúhelníkovitými buňkami s tenkými buněčnými stěnami. Tvoří největší část bobule, 75 – 85 % z celkové hmotnosti bobule. Obsahuje organické kyseliny (kyselinu vinnou a jablečnou), cukry (glukózu a fruktózu) a také draslík, vápník, hořčík, sodík a zinek [9].

Semena patří k typu anatropních (obrácených) semen, jejich délka bývá 3 – 8 mm, šířka 3 – 5 mm.

Tvoří 0 – 6 % z celkové hmotnosti bobule. Zralá semena mívají hruškovitý tvar s prodlouženým zobáčkem. Jsou významným zdrojem fenolických látek (20 – 55 %). Morfologie semen, počet semen v bobuli, hmotnost semena jsou závislé na stanovišti, ročníku a ošetřování vinice [9].



Obrázek 3 Popis hroznu a bobule [15]

Tabulka 1 Morfologické rozdíly mezi lesní a ušlechtilou vinnou révou [9]

	Lesní réva vinná	Ušlechtilá réva vinná
Pohlaví	dvoudomé	jednodomé
Stanoviště	vlhké půdy	suché půdy
Kvetení	začátek května až začátek června	polovina května až polovina června
Tvar bobule	malá, kulatá nebo zploštělá	velká a podlouhlá
Kmen	často rozvětvený, tenký, kůra se odděluje ve velmi dlouhých tenkých prouzcích	silná kůra se odděluje v širších a souvislejších prouzcích
Semena	malá, zaoblená, vyšší poměr mezi šířkou a délkou (> 0,7)	velká, hruškovitý tvar, nižší poměr šířky a délky (<0,6)
Hrozen	malý, kulovitý až kuželovitý, nepravidelná násada a nerovnoměrná zralost bobulí v hroznu	velký, podlouhlý, kompaktní, rovnoměrná zralost bobulí v hroznu
Listy	malé, obvykle hluboce trojlaločné, řapík krátký a tenký	velké, výrazněji vykrajované, řapík silný, lysý

2.2.1 Taxonomie [16]

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	révotvaré (<i>Vitales</i>)
Čeleď:	révovité (<i>Vitaceae</i>)
Rod:	réva (<i>Vitis</i>)
Druh:	<i>Vitis vinifera</i> L.

2.3 Hlavní účinné látky obou studovaných rostlin

Chemické složení aronie a hroznového vína závisí na mnoha faktorech, jako jsou odrůda, zrání plodů, doba a lokalita sklizně. Bobule jsou bohaté na vitamíny, minerály. Řadí se také mezi jedny z nejbohatších rostlinných zdrojů polyfenolů, zejména proanthokyanů, fenolických kyselin a anthokyanů [2,9].

2.3.1 Minerální látky a vitamíny

Minerální látky jsou nutné pro udržování osmolality vnitřního prostředí, pro činnost enzymů, hormonů, také jsou součástí oporných struktur. Vitamíny jsou esenciální složky potravy a strukturně velmi různorodé látky. Spolu s minerálními látkami se nacházejí v běžné potravě, nejvíce však v ovoci, zelenině, obilovinách i živočišné potravě [17].

V aronii z minerálních látek jsou přítomny prvky: vápník, sodík, draslík, hořčík, železo a měď. Celkový obsah minerálů (popelové hodnoty) v čerstvých bobulích byl stanoven na 440 mg na 100 g a jiným autorem na 580 mg na 100 g. Z vitamínů jsou nejvíce zastoupeny vitamín C, K, vitamíny skupiny B (B1, B2, B6), kyselina listová a askorbová, β -karoten a β -kryptoxanthin [2,18].

Nejvíce zastoupené minerální látky ve vinné révě jsou draslík, hořčík, vápník. Draslík v hroznech ovlivňuje obsah kyseliny a hodnotu pH ve víně a moštu. Hořčík způsobuje nahořklou chuť a vápník ovlivňuje aromatické látky. Z vitamínů jsou v révě nejvíce zastoupeny vitamín C a vitamín E. Dále vitamíny B2, B6. Koncentrace vitamínu C byla stanovena mezi 10 – 15 mg.g⁻¹ [14,19,20,21].

2.3.2 Vlákna

Vlákna je definována jako všude přítomná složka rostlinných potravin. Zahrnuje různorodé chemické a morfologické struktury, které jsou odolné vůči působení lidských trávicích enzymů. Hlavní složky jsou celulóza, hemicelulóza, pektiny, lignin, oligosacharidy, gumy [22].

Podle studií plody aronie obsahovaly 5,62 g vlákniny na 100 g čerstvého ovoce. Čerstvé malvice obsahují relativně málo pektinu, obsah se pohybuje okolo 0,3 – 0,6 % [4].

Ve vyliscích bílého vína bylo nalezeno 79 g vlákniny na 100 g vylisků. Červené víno obsahovalo 29 g vlákniny ve 100 g vylisků [23,24].

2.3.3 Polyfenolické sloučeniny

Polyfenoly jsou hojné mikroživiny v naší stravě a objevují se důkazy o jejich roli v prevenci degenerativních onemocnění, jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění. Ve vyšších rostlinách bylo identifikováno několik tisíc molekul s polyfenolovou strukturou. Tyto molekuly jsou sekundárními metabolity rostlin a obecně se podílejí na obraně proti ultrafialovému záření nebo proti patogenům. Ve většině případů obsahují potraviny komplexní směsi polyfenolů [25,26].

Velký vliv na obsah polyfenolů mají enviromentální faktory (půdní typ, sluneční záření atd.), stupeň. Skladování může také ovlivnit obsah polyfenolů, které se snadno oxidují. Koncentrace fenolových kyselin se obecně během zrání snižuje, zatímco koncentrace anthokyanů se zvyšují. Vaření a průmyslové zpracování potravin ovlivňuje také obsah polyfenolů, např. mletí rostlinných tkání může vést k oxidační degradaci polyfenolů. Naopak, macerační operace usnadňují difúzi polyfenolů ve šťávě, jak je tomu při vinifikaci červeného vína. Tato macerace odpovídá za skutečnost, že obsah polyfenolů v červených vínech je desetkrát vyšší než ve vínech bílých a je také vyšší než u hroznové šťávy [25,26].

Polyfenolické sloučeniny mohou být rozděleny do skupin v závislosti na počtu fenolových kruhů a na konstrukčních prvcích, které tyto kruhy vzájemně spojují. Rozlišují se tedy fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany [25,26].

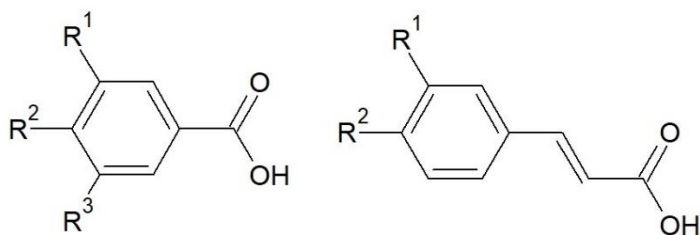
2.3.3.1 Fenolické kyseliny

První skupinou fenolických kyselin jsou deriváty kyseliny benzoové. Obsah kyseliny hydroxybenzoové v jedlých rostlinách je obecně velmi nízký, s výjimkou některých červených plodů, ředkviček a cibule, které mohou mít koncentraci několik desítek miligramů na kilogram. Kromě toho jsou hydroxybenzoové kyseliny složkami komplexních struktur, jako jsou hydrolyzovatelné taniny (gallotanniny v mangu a ellagitanniny v červeném ovoci, jako jsou jahody, maliny a ostružiny) [25,26].

Druhou, běžnější skupinou jsou hydroxykořicové. Sestávají zejména z kyseliny p-kumarové, kávové, ferulové a sinapové. Tyto kyseliny se zřídka nacházejí ve volné formě, s výjimkou zpracovaných potravin, které prošly zmrazením, sterilizací nebo fermentací. Navázané formy jsou glykosylované deriváty nebo estery kyseliny chinové, kyseliny vinné. Kyselina kofeinová a kyselina chinová tvoří kyselinu chlorogenovou, která se nachází v mnoha druzích ovoce a ve vysokých koncentracích v kávě (jeden šálek může obsahovat 70 – 350 mg kyseliny chlorogenové). Ovoce s nejvyšším obsahem (borůvky, kiwi, švestky, třešně, jablka) obsahují 0,5 – 2 g kyseliny hydroxyškoricevé na kg čerstvé hmotnosti. Kyselina kofeinová, jak volná, tak esterifikovaná, je obecně nejhojnější kyselina fenolová a představuje 75 % až 100 % celkového obsahu kyseliny hydroxykořičné ve většině ovoce. Kyselina ferulová je nejhojnější kyselina fenolová, která se nachází v obilných zrnech, která tvoří její hlavní zdroj potravy. Obsah kyseliny ferulové v pšeničném zrně je 0,8 – 2 g.kg⁻¹ suché hmotnosti, což může představovat až 90 % celkových polyfenolů. Kyselina ferulová se nachází hlavně ve vnějších částech zrna [25,26].

Plody aronie jsou nejlepší zdrojem fenolických kyselin, jejichž obsah byl stanoven na 96 mg na 100 g. V červeném víně se koncentrace benzoové a skořicové kyseliny pohybuje

v rozmezí 100 – 200 mg.l⁻¹, zatímco v bílých vínech je jejich koncentrace nižší 10 – 20 mg.l⁻¹ [2,27].



Obrázek 4 *Strukturní vzorce kyseliny benzoové a skořicové* [25]

2.3.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy mají strukturu skládající se ze 2 aromatických kruhů, jsou vázány dohromady třemi atomy uhlíku a tvoří okysličený heterocyklus. Vystavení světlu má značný vliv na většinu flavonoidů. Tyto polyfenolické látky jsou rozděleny do 6 podtříd podle typu heterocyklu: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyanidiny a flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny) [25,26].

Flavonoly

Flavonoly jsou nejvíce všudypřítomné flavonoidy v potravinách a hlavními zástupci jsou quercetin a kaempferol. Obecně jsou přítomny v relativně nízkých koncentracích 15 – 30 mg.kg⁻¹ čerstvého hmotnosti. Nejbohatším zdrojem je cibule (až 1,2 g.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti). Červené víno a čaj také obsahují až 45 mg flavonolů / L. Tyto sloučeniny jsou přítomny v glykosylovaných formách. Flavonoly se hromadí ve vnějších a vzdušných tkáních (listy), jelikož jejich biosyntéza je stimulována světlem. Výrazné rozdíly v koncentraci existují mezi kousky ovoce na stejném stromě a dokonce mezi různými stranami jednoho kusu ovoce, v závislosti na vystavení slunečnímu záření [25,26].

Flavony

Flavony jsou mnohem méně běžné než flavonoly v ovoci a zelenině. Flavony se skládají především z glykosidů luteolinu a apigeninu. Jedinými důležitými doposud identifikovanými jedlými zdroji flavonů jsou petržel a celer. Slupka citrusových plodů obsahuje velká množství polymethoxylovaných flavonů: tangeretin, nobiletin a sinensetin. V humánních potravinách se flavanony nacházejí v rajčatech a některých aromatických rostlinách, jako je máta [25,26].

Isoflavony

Isoflavony jsou flavonoidy se strukturní podobností s estrogy. Ačkoli nejsou steroidy, mají hydroxylové skupiny v polohách 7 a 4 v konfiguraci analogické s hydroxyly v molekule estradiolu. To jim dává pseudohormonální vlastnosti, včetně schopnosti vázat se na receptory estrogenů, a proto jsou klasifikovány jako fytoestrogeny. Isoflavony se vyskytují téměř výhradně v luštěninách. Sója a její zpracované produkty jsou hlavním zdrojem isoflavonů v lidské stravě [25,26].

Flavanoly

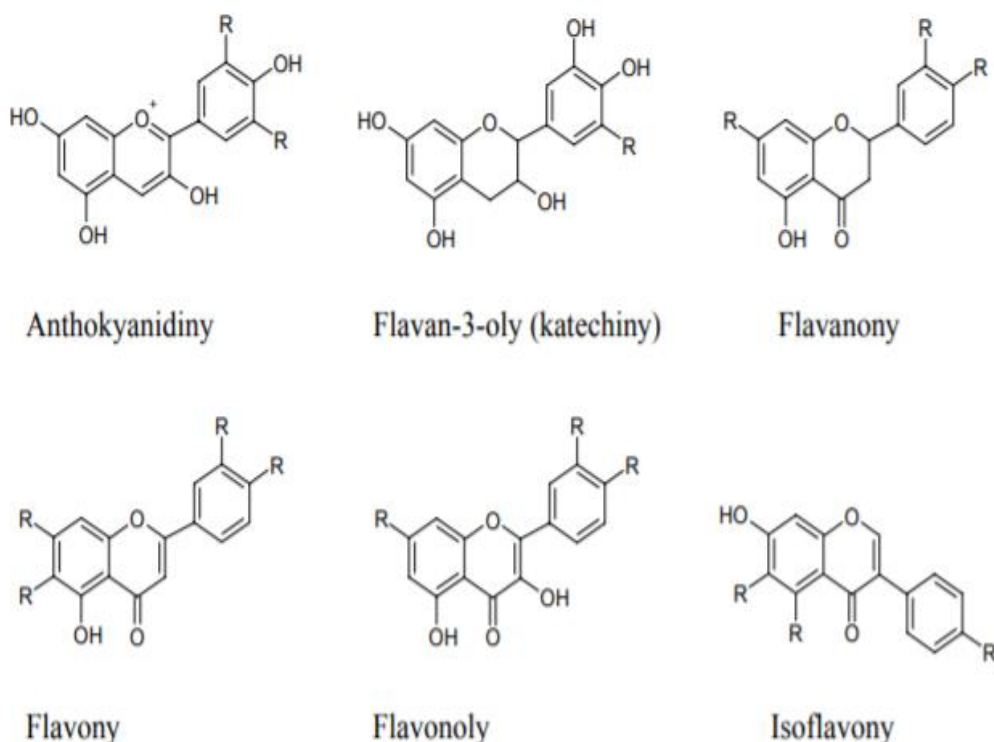
Flavanoly existují jak ve formě monomeru (katechiny), tak ve formě polymeru (proanthokyanidiny). Katechiny se nacházejí v mnoha druzích ovoce (meruňky, které obsahují 250 mg.kg^{-1} čerstvé hmotnosti), jsou také přítomny v červeném víně (až 300 mg.l^{-1}), ale zelený čaj a čokoláda jsou zdaleka nejbohatší zdroje [25,26].

Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny, známé také jako kondenzované taniny, jsou dimery, oligomery a polymery katechinů, které jsou spojeny vazbami mezi C4 a C8 (nebo C6). Vytvářením komplexů se slinnými proteiny jsou kondenzované taniny zodpovědné za svírající charakter ovoce (hrozny, broskve atd.) a nápoje (víno, jablečný mošt atd.) hořkost čokolády [25,26].

Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou pigmenty, které dodávají plodům růžové, červené, modré nebo fialové zbarvení. Existují v různých chemických formách, jak barevných, tak i nezbarvených, podle pH. Jsou odolné vůči světlu, pH a oxidačním podmínkám, které je pravděpodobně degradují. Degradaci zabraňuje glykosylace, obvykle glukózou v poloze 3, a esterifikace různými organickými kyselinami (kyseliny citrónové a jablečné) a fenolickými kyselinami. V lidské stravě, se anthokyaniny nalézají v červeném víně, obilovinách, listové a kořenové zeleniny (lilek, zelí, fazole atd.), ale nejvíce v ovoci. Kyanidin je nejběžnějším anthokyanidinem v potravinách [25,26].



Obrázek 5 Strukturní vzorce flavonoidů [28]

2.3.3.3 Stilbeny

Stilbeny obsahují dvě fenylové skupiny spojené dvoumocným methylenovým můstkem. V lidské stravě je výskyt stilbenů poměrně nízký. Většina stilbenů v rostlinách působí jako fungicidní fytoalexiny, sloučeniny, které jsou syntetizovány pouze v reakci na infekci nebo poranění. Jedním z nejlépe studovaných, přirozeně se vyskytujících stilbenů je resveratrol (3,4', 5-trihydroxystilben), který se vyskytuje převážně v hroznech [26].

2.3.3.4 Lignany

Lignany jsou difenolické sloučeniny, které obsahují 2, 3 - dibenzylbutanovou strukturu, která je tvořena dimerizací dvou zbytků kyseliny skořicové. Několik lignanů, jako je secoisolariciresinol, se považuje za fytoestrogeny. Nejbohatším zdrojem je lněné semeno, které obsahuje až 3,7 g.kg⁻¹ secoisolariciresinolu [26].

Tabulka 2 Obsah polyfenolů v hroznech podle FLANZY (1998) [14]

Flavonoidy	Obsah
Anthokyaniny	slupka 0,5 – 4,0 g.kg ⁻¹ hroznu
	semena 1 – 8 g.kg ⁻¹ hroznu
Taniny-flavanony (katechiny a proanthokyanidiny)	dužnina 1 – 80 mg.kg ⁻¹ hroznu
	slupka 0,3 – 3 g.kg ⁻¹ hroznu
	třapiny 0,03 – 0,4 g.kg ⁻¹ hroznu
Flavanoly	slupka 10 – 100 mg.kg ⁻¹ hroznu
Flavanonoly	slupka 0 – 10 mg.kg ⁻¹ hroznu
	třapiny 0 – 35 mg.kg ⁻¹ hroznu
Ne-flavonoidy	Obsah
Stilbeny	slupka 0 – 20 mg.kg ⁻¹ hroznu
	semena 0 – 35 mg.kg ⁻¹ hroznu
Hydroxyskořicové kyseliny	slupka 60 – 800 mg.kg ⁻¹ hroznu

Tabulka 3 *Obsah polyfenolů v plodech aronie [2]*

Polyfenoly	Obsah
Prokyanidiny	664 mg na 100 g plodu aronie
Anthokyaniny	307 – 631 mg na 100 g plodu aronie
Flavonoly	71 mg na 100 g plodu aronie
Kyselina chlorogenová	302 mg na 100 g plodu aronie
Kyselina neochlorogenová	291 mg na 100 g plodu aronie

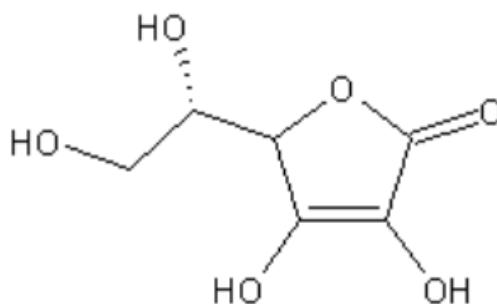
2.4 Celková antioxidační aktivita a postupy jejího stanovení

2.4.1 Antioxidanty

Přírodní antioxidanty jsou látky, které se přirozeně vyskytují v potravinách a mají antioxidační vlastnosti. Antioxidanty, taktéž nazývané inhibitory oxidace, mohou zabránovat nebo omezovat oxidační destrukci látek nebo celých biologických systémů. Mají značný význam z hlediska eliminace volných radikálů, kyslíku a dusíku. Vyskytují se v menších koncentracích než látky, které by měly chránit. Zdrojem antioxidantů jsou zelenina, ovoce, čaje, vína a aromatické, léčivé rostliny. Jsou užitečné při snižování rizik některých druhů onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, karcinogeneze, neurologické poruchy, astma a diabetes [29,30,31,32].

Antioxidanty jsou převážně sekundární metabolity syntetizované rostlinami, jako jsou např. fenolové kyseliny, flavonoidy a terpenoidy. Mezi další antioxidanty patří taktéž glutathion, koenzym Q, vitamíny C, E a karotenoidy, avšak v poslední době se větší význam přikládá právě polyfenolům. Polyfenoly mají důležitou ochrannou funkci v rostlinách, mají antimikrobiální účinky a chrání rostlinu ve stresových podmínkách [30,32,33].

V poslední době získaly polyfenoly velkou vědeckou pozornost díky jejich potenciálnímu léčebnému využití, z důvodu vzniku řady lidských nemocí způsobených volnými radikály [32].



Vitamin C

2.4.2 Volné radikály

Volné radikály jsou jakékoliv molekuly, atomy nebo iony, která obsahuje alespoň jeden nepárový elektron ve valenční sféře. Měly by být schopné alespoň krátkodobé samostatné existence. Mají hlavně důležitý fyziologický význam (přenos energie, signální molekuly buněčné regulace), avšak mohou se stát škodlivými a poškozovat organismus. Nejčastější příčinou je oxidační stres [34,35].

Tyto radikály, můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na dusíkové (RNS) a kyslíkové (ROS). Zdrojem bývají biochemické, fotochemické nebo radiační reakce, taktéž některá chemoterapeutika a přechodné prvky mohou iniciovat vznik radikálů [35].

K zamezení zvýšené tvorby kyslíkových a dusíkových radikálů a také k zachování oxidoredukční rovnováhy využívá organismus různých mechanismů, jako jsou například vychytávání existujících radikálů, zamezování jejich novotvorby, podpory antioxidačních enzymů nebo inaktivaci přechodných kovů [35].

Kyslíkové radikály (ROS-reactive oxygen species)

Volné radikály kyslíku, tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS-reactive oxygen species) jsou meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Řadí se do této skupiny jednak volné radikály superoxidový ($O_2\bullet$), hydroxylový ($OH\bullet$), peroxylový ($ROO\bullet$), alkoxylový radikál ($RO\bullet$) a jednak látky neradikálové povahy, peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$) nebo ozon (O_3) [35].

Dusíkové radikály

Volné radikály dusíku, tzv. reaktivní formy dusíku (RNS-reactive nitrogen species). Do této skupiny se řadí jednak volné radikály, např. oxid dusnatý ($NO\bullet$) a látky neradikálové povahy, např. nitroxid (NO) [35].

2.4.3 Celková antioxidační aktivita

Pojem celková antioxidační aktivita se zkratkou TAA (Total Antioxidant Activity) byl zaveden pro porovnání antioxidačních účinků [36].

Antioxidační aktivitu ovlivňuje zejména koncentrace antioxidantů, přítomnost jiných antioxidantů a jiných látek (např. bílkovin, iontů kovů), taktéž oxidovaný substrát, teplota, přístup kyslíku a světlo. Rovněž při stanovení antioxidační aktivity má vliv na výslednou hodnotu použité rozpouštědlo [37].

V lidském organismu a v systémech in vivo, které slouží k objasnění aktivity antioxidantů, ovlivňují antioxidační aktivitu již zmíněné faktory výše, ale také má vliv uvolňování látek z potravinové matrice, jejich vstřebávání v trávicím traktu a přestup do buněk. V trávicím traktu člověka je vstřebatelnost uvolněných antioxidantů obecně relativně nízká. Mezi nejlépe vstřebatelné antioxidanty patří hlavně kyselina gallová, isoflavony, katechiny, flavanony, proanthokyanidiny a anthokyaniny. Nicméně nevstřebané antioxidanty mohou pozitivně působit v trávicím traktu, který je neustále vystavený řadě oxidantů z potravy. Taktéž příznivě ovlivňují složení střevní mikrobioty a zabraňují vzniku nádorů tlustého střeva a konečníku [37].

U metod in vitro se vyžaduje extrakce analyzovaných tuhých potravin, avšak část antioxidantů při extrakci neprechází do rozpouštědla. To je zapříčiněné nerozpustností

některých antioxidantů. Dalším důvodem může být vazba na nerozpustnou složku potravy nebo na extrakční zbytek a rovněž část antioxidantů je také uzavřena v buněčných či jiných strukturách. Oproti tomu v trávicím traktu dochází nejdříve k hydrolýze přítomných sloučenin, což má za příčinu uvolnění vázaných antioxidantů, a až poté dochází k extrakci. Na druhou stranu dochází během trávení k oxidaci, což vede ke ztrátám antioxidantů. [37]

Bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. Antioxidační aktivita může záviset např. na počtu a poloze hydroxylových skupin vůči karboxylu, jako je tomu u fenolických kyselin. Aktivita antioxidantů roste s rostoucím počtem hydroxylů. Obecnou reakci polyfenolu s radikálem, při kterém vzniká polyfenolový radikál, který je relativně stabilní, popisuje tato rovnice reakce [38]:



2.4.4 Metody stanovení

Existuje velký počet metod, které slouží ke stanovení aktivity antioxidantů. Tyto metody jsou principiálně navzájem odlišné. Jejich rozmanitost vyplývá z toho, že antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji se jedná o přímou reakci s radikálem nebo o reakci s přechodnými kovy. Metody stanovení jsou kategorizovány do dvou skupin, na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a na metody posuzující redoxní vlastnosti látek [30,39].

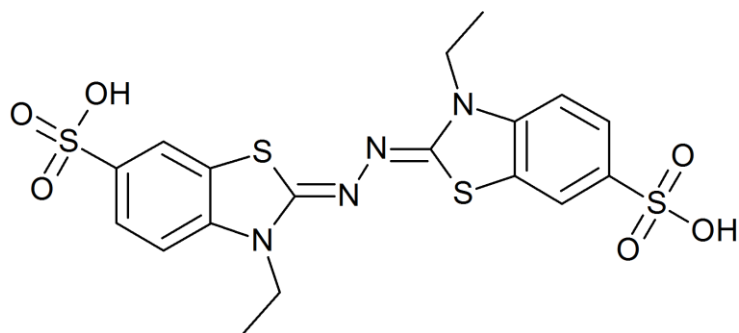
2.4.4.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody jsou založené na schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Nejčastěji jde o radikály kyslíkové (hydroxylové, peroxylové) nebo syntetické (ABTS, DPPH). Tyto radikály jsou buď vygenerované nebo se přidávají do reakční směsi [30].

Metoda používající ABTS (metoda TEAC)

Tato metoda hodnotí eliminaci syntetických radikálů, testuje schopnost vzorku zhaset kation radikál ABTS•+. Jelikož výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávaná s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu, nazývá se tato metoda TEAC. Nejčastěji se sleduje úbytek radikálu ABTS•+, tedy se sleduje změna absorpčního spektra, pomocí spektrofotometru při vlnové délce 734 nm. Dochází k odbarvování radikálu, jelikož se v přítomnosti antioxidantů radikál redukuje. Antioxidanty se chovají jako donory vodíku, dochází tedy k zhasení radikálu ABTS•+. Oxidací ABTS se generuje kation-radikál ABTS•+, nejčastěji se provádí oxidace peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganičitým [30,39,40].

Celková antioxidační aktivita vzorku se hodnotí parametrem TEAC, který stanovuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. TEAC je definovaný pro čisté látky jako milimolární koncentrace Troloxu, který vykazuje stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l⁻¹ TEAC udává pro směsi koncentraci Troloxu (mmol.l⁻¹) a ta je rovna antioxidační aktivitě vzorku. Touto metodou se dá TAA stanovit v čistých látkách, vodných roztocích a nápojích [30,36].

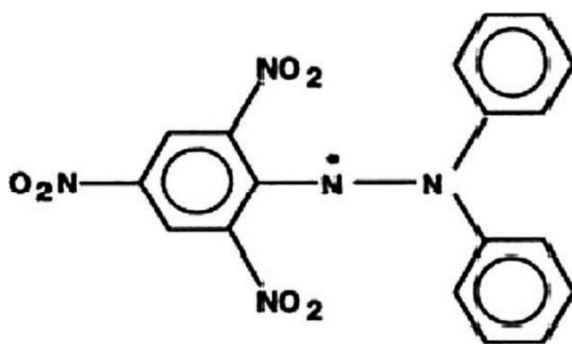


ABTS

Metoda používající DPPH

Tato metoda taktéž hodnotí eliminaci syntetických radikálů a používá se k posouzení antioxidační aktivity směsných vzorků a čistých látek. Metoda je založena na reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH, ve které dochází k redukci nepárového elektronu radikálu za vzniku DPPH-H. Reakce se taktéž sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Lze sledovat reakci i metodou EPR nebo HPLC. Někdy se u směsných vzorku radikálová aktivita vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu [30,41].

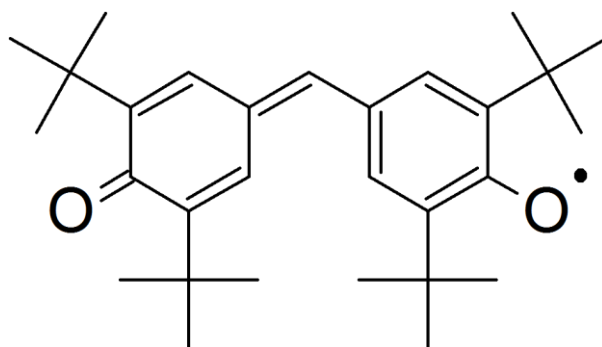
Metoda DPPH může být použita ve vodných a nepolárních organických rozpouštědlech. Nejčastěji se připravuje roztok DPPH v methanolu nebo ve vodě. Výhodou této metody je, že DPPH může reagovat s celým vzorkem a dostatečná doba umožňuje DPPH reagovat pomalu i se slabými antioxidyanty [41].



Radikál DPPH

Metoda používající galvinoxyl

Tato metoda spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu látkami, která poskytují vodík. Reakce se dá sledovat pomocí ESR nebo spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm [30].



Radikál galvinoxyl

Metoda ORAC

Metoda ORAC hodnotí schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci v systému, který generuje kyslíkové radikály. Sleduje se úbytek fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH, při generaci hydroxylových radikálů systém $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. Tuto metodu můžeme využít u vzorů různého druhu [30].

Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů se zavedly fluorescenční sondy jiného typu, fluoresceinu (FL). Jelikož při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů, bylo nutná omezení (např. omezená fotostabilita) [30].

Metody založené na vychytávání OH-radikálů

OH-radikály jsou generovány různými postupy (např. Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku). Metoda je založena na vychytávání radikálů látkami. Antioxidaty vychytávající OH (např. kyselinou salicylovou). Další možností stanovení je pomocí DMPO. Detekce se provádí metodou HPLC, UV detekcí [30].

Metody založené na vychytávání superoxidového anion- -radikálu

K tvorbě radikálu se používá neenzymové reakce 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH nebo systém xanthin/xanthinoxidasa. Radikál, který vznikl, redukuje nitrotetrazoliovou modř. Detekce se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 550–560 nm. Rovněž je možné detekovat metodou ESR na základě reakce superoxidového anion-radikálu s DMPO. Dále se využívá kombinace HPLC a chemiluminiscence. K měření se používá luminol, který je schopen reagovat se kyslíkovými radikály. Měří se jakási zábrana chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC [30].

Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu, který je vyvolán volnými radikály, je lipidová peroxidace. Kyslíkové radikály ($\text{OH}\cdot$), sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (alkoxyl, peroxy) jsou eliminovány látkami, které potlačují lipidovou peroxidaci. Tyto látky mohou působit jako látky chelatující ionty přechodných kovů [30].

Bylo vyvinuto mnoho metod, které hodnotí vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci. Často se využívá fosfolipidových liposomů nebo se sleduje lipidová peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL-částicích. Další možností jsou metody založené

na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Produkty peroxidace jsou sledovány opět spektrofotometricky při vlnové délce 234 nm. Iniciátor radikálové reakce je APPH. Modifikací je metoda používající β -karotenu a linolové kyseliny. Metoda se taktéž stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm. Tato metoda s β -karotenem slouží k vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vzorků a je i vhodná pro screening směsných vzorků. Další modifikací je metoda TLC. Nejvíce využívaná metoda je TBA-MDA, která je založena na stanovení MDA, na základě reakce s TBA. Absorbance se měří při vlnové délce 532 nm [30].

2.4.4.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností

Antioxidanty, které jsou neenzymové, jsou řazeny jako redukční činidla, která redukují oxidanty a tím je inaktivují. Antioxidační aktivita se u těchto metod posuzuje na základě redukční schopnosti látky [30].

Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na principu redoxní reakce, antioxidanty redukují ze vzorku komplex Fe^{3+} -TPTZ. Mírou antioxidační aktivity vzorku je odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ. Nárůst absorbance se měří při vlnové délce 593 nm. Měření probíhá za fyziologicky nízké hodnoty pH (3,6) dále nejsou zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem pomalu [30,36].

Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je metoda, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí. Sledují se proudové odezvy v roztoku, které jsou zachycovány křivkou tzv. cyklický voltamogram [30].

Vyhodnocování se provádí dvěma parametry, z potenciálu anodického oxidačního píku a jeho anodického proudu. Je-li nižší hodnota anodického oxidačního píku, látka snadněji odevzdává elektrony a může být účinnějším antioxidantem. Je možné určit koncentraci látek z hodnoty výšky proudu. Tato metoda slouží k vhodnému zvolení metod na stanovení antioxidační kapacity [30].

HPLC s chemickou detekcí

Touto metodou lze velmi přesně detegovat elektroaktivní látky. Nejčastějšími detektory jsou amperometrické nebo coulometrické. Metoda funguje tak, že se na pracovní elektrodu vkládá určitý kladný potenciál. Pokud je látka při tomto potenciálu oxidována, objeví se pík. Charakterizaci látky lze nejen provést retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se látka oxidační. Metoda umožňuje analyzovat směsi a identifikaci antioxidantů ve směsi [30].

2.5 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)

EPR je spektroskopická technika, kterou lze využít při stanovení antioxidační aktivity. Je založena na detekci látek, které mají nepárové elektrony. Ty zahrnují volné radikály, mnoho iontů přechodných kovů a defekty v materiálech. Volné elektrony jsou často s krátkou životností, ale stále hrají klíčovou roli v mnoha procesech, jako jsou fotosyntéza, oxidace, katalýza a polymerační reakce [42].

Touto metodou se detekují přechody nepárových elektronů v aplikovaném magnetickém poli. Magnetický moment způsobuje, že se elektron chová jako malý magnet. Když dodáváme vnější magnetické pole, mohou se paramagnetické elektrony orientovat buď ve směru paralelním nebo antiparalelním ke směru magnetického pole. To vytváří dvě odlišné hladiny energií pro nepárové elektrony a umožňuje nám je měřit. Ze začátku bývá více elektronů v nižší energetické hladině (tj. paralelně s polem) než v horní úrovni (antiparalelní). Používá se pevná frekvence mikrovlnného ozařování k excitaci některých elektronů v nižší energetické úrovni na vyšší energetickou úroveň. Aby k přechodu došlo, musí být také vnější magnetické pole se specifickou pevností, tak aby oddělení energie mezi dolním a horním stavem bylo přesně přizpůsobeno naší mikrovlnné frekvenci [42].

2.6 Ovocné výlisky jako surovina pro další zpracování

2.6.1 Vinné matoliny

Vinné matoliny zaujímají největší podíl (13 %) odpadu při zpracování vinných hroznů. Součástí vinných matolin jsou slupky, semena a stopky. Velmi často se z matolin vyrábí lihovina matolinovice (matolinová pálenka), která má mít minimálně 37,5 obj. % ethanolu. Taktéž se dá z matolin vyrobit matolinové víno. Macerací matolin ve vodě lze získat výluh, který slouží k výrobě např. nealkoholický nápojů. Malá vinařství zpracovávají tento odpad na kompostování. Matoliny nejsou příliš vhodné jako krmivo pro býložravce, kvůli vysokému obsahu ligninu, polyfenolů a draslíku a nízké nutriční hodnotě. Vinná semena obsahují vysoké množství nenasycených mastných kyselin. Využívají se pro výrobu vinných olejů [43,44,45].

Vinné matoliny jsou významným zdrojem pro získání přírodních antioxidantů. Do potravin se antioxidanty přidávají nejběžněji za účelem prodloužení jejich trvanlivosti, jelikož oxidativní jevy znehodnocují potraviny, např. tuky. Důsledkem oxidativních jevů je snížená výživová a senzorická hodnota potraviny. Antioxidanty se uplatňují taktéž jako stabilizátory barvy potravinářských výrobků. Nejvyšší povolené množství a druhy antioxidantů stanovuje legislativa [43].

V lékařství se antioxidanty používají proti kardiovaskulárním onemocněním. Antioxidanty svým působením předchází peroxidační reakci lipidů a tím zabraňují tvorbě těchto onemocnění, která jsou spjata právě s vysokou hladinou cholesterolu v krvi. Dále se antioxidantům přiřazují antikarcinogenní účinky, který souvisí s inhibicí oxidativních mutací DNA. V posledních letech se studují antimikrobiální účinky polyfenolů [43].

2.6.2 Aroniové výlisky

Aroniové výlisky jsou stejně jako matoliny bohaté na antioxidační látky. Mohou se taktéž využít jako zdroj aditiv, které prodlužují trvanlivost a obohacují potravinu o důležité látky. Dají se také použít usušené k přípravě čajů, k dochucování jídla nebo jako doplněk stravy. Obsahují nemalá množství polyfenolických sloučenin, hlavně anthokyanů. V potravinářství se dají anthokynová barviva využít jako potravinářská barviva. Je možné že v následujících letech dojde k odseparování těchto barviv z aronie a následnému využití v potravinářství. Antioxidanty v aronii působí proti kardiovaskulárním onemocněním., mají taktéž protirakovinotvorné a protizánětlivé účinky [46].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

3.1.1 Přístroje

- Sušárna (Memmert)
- Analytické váhy (Boeco)
- Míchačka (Vortex)
- Spektrofotometr (Helios Delta)
- EPR (MiniScope MS 300)

3.1.2 Pracovní pomůcky

- mikropipeta Finnpiptette F1, Thermo scientific (objem 0,1–1,0 ml) a špičky
- mikropipeta Finnpiptette F1, Thermo scientific (objem 0,5–5,0 ml) a špičky
- mikropipeta Finnpiptette F1, Thermo scientific (objem 0,02–0,2 ml) a špičky
- kyveta na spektrofotometr
- zúžená kyveta na spektrofotometr
- kyveta pro EPR, Magnettech (SRN)
- zkumavky se stojanem
- mikrofiltry a stříkačky
- odměrné a laboratorní sklo

3.1.3 Chemikálie

- Destilovaná voda
- Ethanol 96 % CH_4O , VWR Chemicals s.r.o
- Kyselina chlorovodíková 37 %, HCl (Analytika, spol. s.r.o.)
- Pepsin, Organofarma n.p., ČR
- Kyselina gallová (Sigma–Aldrich, s r.o.)
- Uhličitan sodný Na_2CO_3 (Lach–Ner, s r.o.)
- Folin–Ciocaultovo činidlo (Sigma–Aldrich, s r.o.)
- ABTS 98%, diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazolin)-6-sulfonové kyseliny) $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$, Sigma-Aldrich, CAN
- Trolox 97%, ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, Sigma-Aldrich, RUS
- Peroxodisíran draselný $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Lach – Ner, s.r.o., ČR

3.1.4 Příprava roztoků

Roztok radikálu ABTS byl vždy připravován čerstvý, jelikož tento radikál po určitém čase degradoval. Všechny připravené roztoky byly uskladněny v ledničce a roztok radikálu ABTS byl zabalen v alobale a uchován taktéž v lednici.

Žaludeční šťáva

0,5 g pepsinu se rozpustilo ve 200 ml vody a bylo přidáno 2 g koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Kyselina gallová

Do odměrných baněk o objemu 50 ml byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentraci 100, 200, 300, 400, a 500 mg.l⁻¹ kyseliny gallové.

Uhličitan sodný

7,5 g Na₂CO₃ bylo naváženo na předvážkách a kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

Folin–Ciocaultovo činidlo

Folin–Ciocaultovo činidlo bylo naředěno destilovanou vodou v poměru 1:9.

Trolox

Do odměrných baněk o objemu 10 ml byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentraci 100, 200, 300 a 400 mg.l⁻¹ Troloxu. Standart Trolox se rozpustil v 60% ethanolu.

ABTS

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0384 g ABTS, 0,0066 g K₂S₂O₄ a obě tyto látky byly kvantitativně převedeny do 10 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

3.2 Analyzované vzorky

K analýze byly použity zmražené výlisky bílé, modré vinné révy a bezu černého. Tyto výlisky byly sušeny při 40 °C do konstantní hmotnosti. Před uchováním byly výlisky pomlety a následně uchovány v uzavřené nádobě v lednici. Vzorky *Aronia melanocarpa*, pomleté a drcené, a kapsle z aronie a bílého hroznu byly dodány soukromým pěstitelem a byly také uchovány uzavřené a v temnu.



Obrázek 6 Analyzované vzorky

3.3 Stanovení obsahu vody ve výliscích sušených do konstantní hmotnosti při 40 °C a při 105 °C

Na Petriho misky bylo naváženo 6-15 g výlisků černého bezu, modré a bílé vinné révy. Vzorky byly sušeny při 40 °C asi 72 hodin. Následně byly vzorky umístěny do exsikátoru a zváženy. Dále byly vzorky opět umístěny do sušárny a po hodině opět po vychladnutí zváženy a opět vráceny do sušárny. Proces se opakoval, dokud nebyl rozdíl mezi dvěma posledními hodnotami menší než 2 mg. Obsah vody byl pro každý vzorek stanoven jedenkrát.

Taktéž byl stanoven obsah vody při 105 °C a sušilo se asi 48 hodin. Hliníkové kelímky byly vysušeny v sušárně a po vychladnutí v exsikátoru byly zváženy na analytických vahách. Do každého kelímku bylo naváženo přibližně 5 g výlisků černého bezu, modrého a bílého hroznů, již sušených při 40 °C. Dále byl postup stejný jako u sušení při 40°C. Proces se opakoval, dokud nebyl rozdíl mezi dvěma posledními hodnotami menší než 2 mg. Obsah vody byl pro každý vzorek stanoven jedenkrát.

Celkový obsah sušiny ve vzorku se stanovil z podílu hmotnosti vzorku po vysušení a hmotnosti před sušením a vyjádří se v hmotnostních procentech. Celkový obsah sušiny je tedy vypočítán podle rovnice 2:

$$w_s = \frac{m_s}{m_{vz}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

kde w_s je obsah sušiny v %hm.

m_s je hmotnost sušiny

m_{vz} je hmotnost původní navážky plodů.

Celkový obsah vody ve vzorku se stanoví jako rozdíl 100 % a w_s , viz. rovnice 3:

$$w_v = 100 \% - w_s \quad (3)$$

Kde w_v je obsah vody v %hm.

3.4 Extrakce výlisků a mletých výlisků

3.4.1 Extrakce ethanolu v ethanolu a ve vodě

Přibližně 3 g bezinek byly extrahovány v čisté vodě, v ethanolu a ve 3 různých poměrech těchto dvou rozpouštědel:

5 ml H₂O na 20 ml EtOH

10 ml H₂O na 15 ml EtOH

15 ml H₂O na 10 ml EtOH.

Vzorky byly míchány na míchačce při laboratorní teplotě a v časech 15, 30, 60, 90 a 120 minut od začátku byly odebírány vzorky extraktů. Odebrané vzorky byly přefiltrovány přes mikrofiltry a naředěny 10x. Dále byly vzorky použity ke stanovení celkových fenolických látek a stanovení optimálních podmínek pro následující měření.



Obrázek 7 Optimalizace extrakce v rozpouštědlech EtOH a voda

3.4.2 Extrakce v uměle vytvořené žaludeční šťávě

Přibližně 3 g výlisků a 0,5 g tabletek byly extrahovány v uměle připravené žaludeční šťávě a byly míchány na míchačce při laboratorní teplotě. Kapsle byly extrahovány vcelku, jelikož samotná tobolka je rozpustitelná v žaludeční šťávě. V časech 0, 5, 10, 20 a 30 minut od začátku byly odebírány vzorky extraktů. Odebrané vzorky byly přefiltrovány a použity pro spektrofotometrické stanovení celkové koncentrace fenolických látek.

3.5 Stanovení celkových fenolických látek v připravených extraktech

Do každé zkumavky byl napipetován 1 ml zředěného Folin–Ciocaultova činidla, 1 ml destilované vody a 0,1 ml přefiltrovaného extraktu. Zkumavky byly promíchány a reakční směs se nechala stát 5 minut. Po 5 minutách byl do každé zkumavky napipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Vše bylo promícháno a po 15 minutách stání byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku. Zároveň se vzorky byl připravován slepý vzorek, kde namísto 0,1 ml vzorku bylo použito 0,1 ml destilované vody. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních.

Obsah celkových fenolických látek ve vzorku byl stanoven dosazením získané absorbance vzorku do rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové. Koncentrace je následně přepočítána na obsah polyfenolů v mg na g suchého podílu. Viz rovnice 4 a 5.

$$c = \frac{A}{k} \quad (4)$$

kde c je koncentrace celkových fenolických látek v mg.l^{-1}

A je průměrná hodnota naměřené absorbance

k je směrnice kalibrační přímky

$$x = \frac{c \cdot V}{m} \quad (5)$$

kde x je koncentrace celkových fenolických látek přepočtena na sušinu v mg.g⁻¹

V je objem rozpouštědla

m je hmotnost navážky

3.6 Stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů

3.6.1 Technika EPR

Měření bylo realizováno v křemenné ploché kyvetě pro EPR, která byla opatřena injekční stříkačkou. Spodní konec kyvety byl po naplnění ucpán pomocí parafilmu. Nejdříve byl přichystán roztok ABTS•+ a ten byl uchován ve tmě a chladu minimálně 12 hodin. Před každým měřením byl roztok ABTS•+ naředěn 1:1 vodou a byla vždy zkontrolována stabilita referenčního roztoku ABTS•+. Naředěný referenční roztok, následně i vzorek, byly vždy promíchány stejně a kyveta byla pokaždé vložena do EPR spektrometru stejným způsobem. Nejdříve byl proměřen radikál, poté byly nastaveny parametry měření reálných vzorků. Následně byla kyveta vyčištěna a vysušena. Připravený přefiltrovaný extrakt byl podle potřeby naředěn, poté smíchán 1:1 s roztokem ABTS•+. Pro každý vzorek byl nastaven časový limit 1 minuta na smíchání s ABTS•+ a vložení do dutiny EPR spektrometru. Poté proběhlo vlastní měření. Byl sledován časový vývoj antioxidační aktivity po dobu 18-25 minut.

Parametry EPR

- BO-field: 3360 [G]
- Sweep: 149,92 [G]
- Sweep time: 12 [s]
- Modulation: 5000 [mG]
- MW atten: 10 [dB]
- Gain: 5
- Smooth: 0 [sec]
- Steps: 4096
- Number (pass): 10

3.6.2 Spektrofotometrické stanovení pomocí ABTS•+

Zásobní roztok kationt radikálu ABTS•+ byl zředěn ethanolem na absorbanci 0,7 ±0,02 při vlnové délce 734 nm, měřeno proti ethanolu. Do kyvety byl napipetován 1 ml zředěného kation radikálu ABTS•+ a 0,01 ml vzorku. Byl sledován časový vývoj antioxidační aktivity v čase 0-15 minut. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet poklesu absorbance byla využita rovnice 5:

$$A = A_0 - A_{15} \quad (6)$$

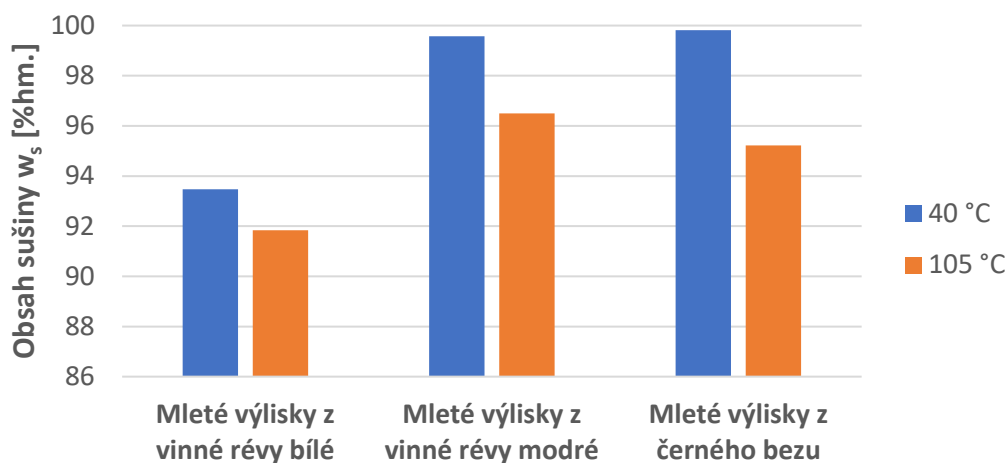
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Nejdříve byly zjištěny optimální podmínky extrakce pro stanovení celkových fenolických látek. Dále byly za zjištěných optimálních podmínek extrahovány výlisky a tabletky, z nich byla stanovena spektrofotometricky celková koncentrace polyfenolů. Pro metody EPR a TEAC bylo využito extrakce taktéž za zjištěných optimálních podmínek. Vzorky pro EPR a TEAC byly uchovány v lednici.

4.1 Stanovení obsahu vody ve výliscích sušených do konstantní hmotnosti při 40 °C a při 105 °C

Důvodem tohoto stanovení je nutnost uchovat čerstvé výlisky pro pozdější zpracování. Je potřeba vysušit výlisky tak, aby nepodléhaly zkáze, ale aby v nich zůstalo zachováno co nejvíce biologicky aktivních látek

Stanovení obsahu vody a sušiny sušením bylo provedeno podle kapitoly 3.3. Výsledné hodnoty sušiny a obsahu vody jsou zaznamenány v Tabulce 5 (viz Příloha), Grafu 1 a Grafu 2.



Graf 1 Stanovení obsahu sušiny



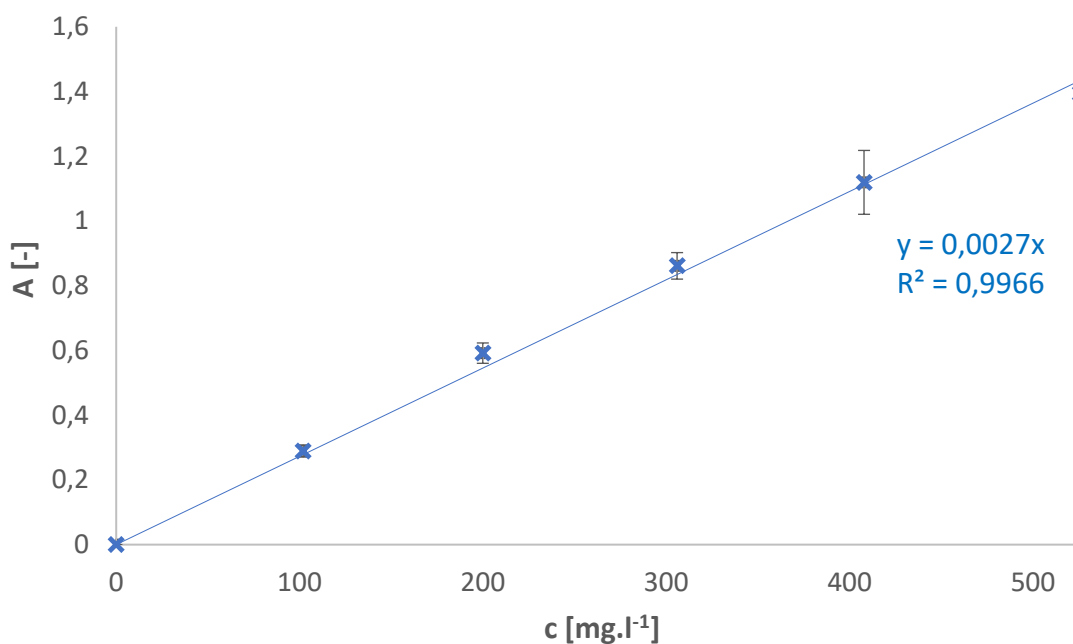
Graf 2 Stanovení obsahu vody

Při teplotě 40 °C a 105 °C byla stanovena nejvyšší hodnota obsahu vody 6,52 %hm. a 8,16 %hm. ve výliscích bílého hroznů. Nejnižší hodnotu při 40 °C měl vzorek černého bezu, naopak při 105 °C měl nejnižší hodnotu obsahu vody vzorek výlisků červeného hroznů.

4.2 Extrakce výlisků a mletých výlisků

Pro získání extraktů s maximálním obsahem účinných látek bylo nutno najít vhodné extrahovací, případně směs rozpouštědel. Aby bylo možno hodnotit účinnost jednotlivých extrakčních činidel, posuzoval se obsah celkových fenolických látek. K tomu byla využita metoda podle Folin-Ciocalteua. Tato metoda detekuje všechny fenolové skupiny ve zkoumaných vzorcích i ty, které jsou vázány na proteiny. Nevýhodou tohoto činidla je, že reaguje se snadno oxidovatelnými látkami (např. oxidem siřičitým, kyselinou askorbovou, aromatickými aminy) a to může vést ke zkreslení výsledků [47].

Byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové, na kterou se obsah fenolických látek stanovený tímto postupem obvykle přepočítává. Kalibrační křivka je zaznamenána do následujícího Grafu 3.



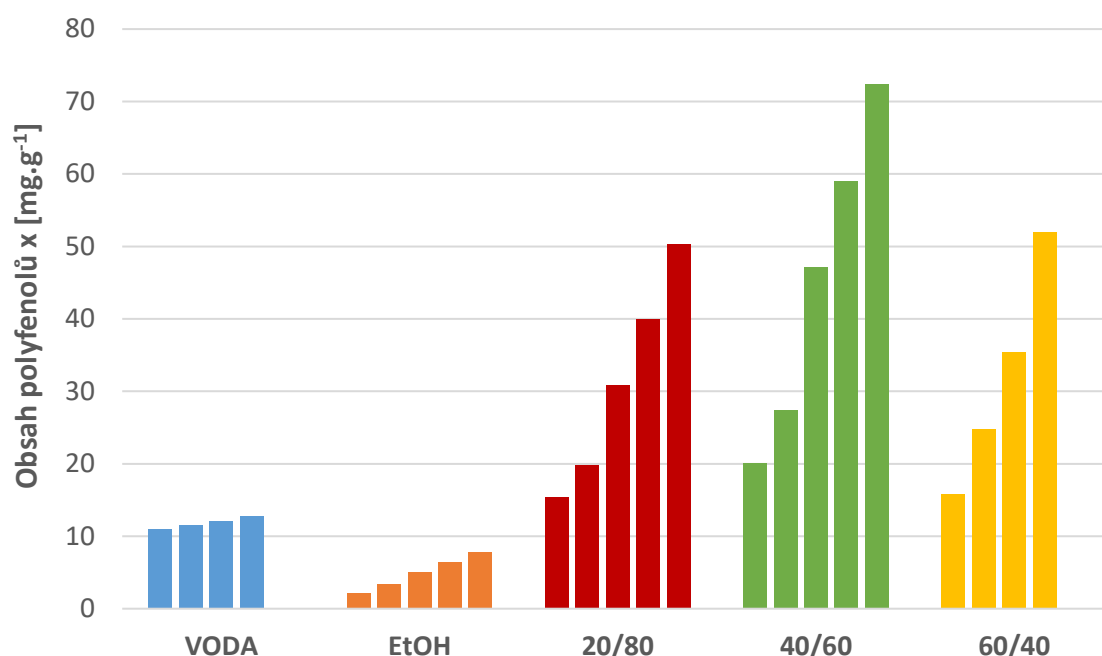
Graf 3 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Optimalizace extrakce byla provedena analýzou celkového obsahu fenolických látek podle postupu v kapitole 3.4.1. Jako extrakční činidla byla použita směs vody a ethanolu v různém poměru a syntetická žaludeční šťáva. Stanovené koncentrace byly přepočítány na sušinu.

4.2.1 Extrakce bezových výlisků ve vodě, ethanolu a jejich směsích

Pro optimalizaci extrakce ve vodě, ethanolu a jejich směsích, byly zvoleny výlisky černého bezu. Jako extrakční činidlo byla použita destilovaná voda, 96% ethanol a směsi vody

a ethanolu v poměrech 20 : 80; 40 : 60 a 60 : 40 (V/V). Postup extrakce je uveden v kapitole 3.4.1. Vzorky jednotlivých extraktů byly odebírány po 15, 30, 60 a 120 min. Výsledky jsou zaznamenány do Grafu 4.



Graf 4 Optimalizace extrakce pro výlisky černé bezy

Z výsledků je zřejmé, že volba rozpouštědla a doba extrakce mají velký vliv na obsah fenolických látek v extraktu. S rostoucím časem extrakce se zvyšuje výtěžnost fenolických sloučenin. V případě čisté destilované vody se v průběhu dvou hodin výtěžnost příliš neměnila. Stejně jako u čisté destilované vody, tak i u směsi vody a ethanolu v poměru 60:40 nebylo možné odebrat extrakt ve 120. minutě.

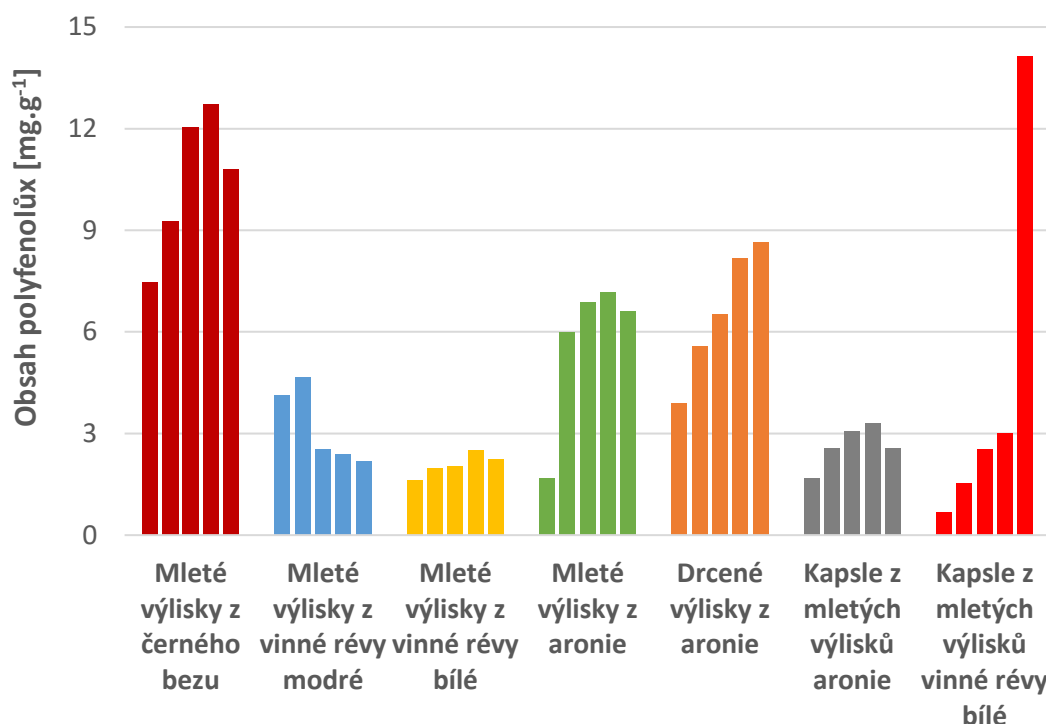
Nejúčinnějším extrakčním rozpouštědlem byla směs vody a ethanolu v poměru 40:60, kdy obsah polyfenolů ve výliscích po dvou hodinách extrahování byl stanoven na 72,43 mg.g⁻¹. Nejmenší množství fenolických látek bylo stanoven při použití ethanolu jako extrakčního činidla, pravděpodobně kvůli horší rozpustnosti fenolických látek.

4.2.2 Extrakce v simulované žaludeční šťávě

Extrakce výlisků tímto simulantem umožňuje odhadovat, jak intenzívně dochází k uvolňování anthokyanových barviv v prostředí lidského žaludku. Některé drcené nebo mleté výlisky uzavřené v kapslích by měly být určeny ke konzumaci jako potravní doplňky.

Celkem bylo simulantem žaludeční šťávy extrahováno 7 druhů výlisků: z bezinek, modré a bílé vinné révy, mleté výlisky z aronie, drcené výlisky z aronie, kapsle s mletými aroniovými

výlisky a kapsle s mletými výlisky bílých hroznů. Postup extrakce je uveden v kapitole 3.4.2. Kapsle byly extrahovány celé. Všechny výsledky jsou zaznamenány do Grafu 5.



Graf 5 Extrakce různých výlisků v simulantu žaludeční šťávy

Na výtěžnost extrakce má také vliv pH prostředí. V případě uměle připravené žaludeční šťávy se pH pohybovalo přibližně v hodnotě $0,9 \pm 0,2$, což má za následek nižší výtěžnosti. Celkový obsah fenolických látek byl analyzován v průběhu 0-30 minut, avšak neplatí, že s rostoucím časem extrakce roste obsah polyfenolů. Nejspíše z důvodu degradace fenolických látek vzniklými radikály.

Při extrakci výlisků černého bezu v žaludeční šťávě bylo extrakční maximum ve 20. minutě stanovené na $12,72 \text{ mg.g}^{-1}$, ve 30 minutě došlo k poklesu obsahu polyfenolů na $10,81 \text{ mg.g}^{-1}$. V porovnání s množstvím polyfenolů bezu, stanoveném v 15 minutě na $20,11 \text{ mg.g}^{-1}$, ve směsi vody a ethanolu (40:60), byl obsah extraktu v žaludeční šťávě o dost nižší.

V případě výlisků modré odrůdy révy bylo stanoveno extrakční maximum v 10 minutě na $4,65 \text{ mg.g}^{-1}$. V následujících 20 minutách došlo k poklesu skoro o polovinu obsahu extrakčního maxima.

U výlisků bílého hroznů a mletých výlisků aronie byla maximální výtěžnost polyfenolů ve 20 minutě určena na $2,51 \text{ mg.g}^{-1}$ a na $7,16 \text{ mg.g}^{-1}$. Pro vzorek drcených výlisků aronie byla zjištěna nejvyšší hodnota obsahu fenolických látek ve 30 minutě, $8,64 \text{ mg.g}^{-1}$. V případě kapslí, především u aronie, bylo množství polyfenolů nižší. Kapsle s mletými aroniovými výlisky dosahovaly svého maxima ve 20 minutě a stanovený obsah odpovídal $3,29 \text{ mg.g}^{-1}$. Nízký obsah fenolických látek byl pravděpodobně způsoben neúplným rozpuštěním kapsle, dokonce i po 2 hodinách stání a občasném míchání kapsle držela v celku, kapsle se sice

rozpustila, ale nedošlo k úplné extrakci. U kapslí z mletých matolin bílého hroznového vína poslední hodnota obsahu vyšší než poslední hodnota obsahu výlisků matolin bílého vína. Množství fenolických látek bylo určeno na $14,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Vyšší obsah fenolických látek než u kapslí z aronie byl způsoben lepším rozpuštěním kapsle a matolin.

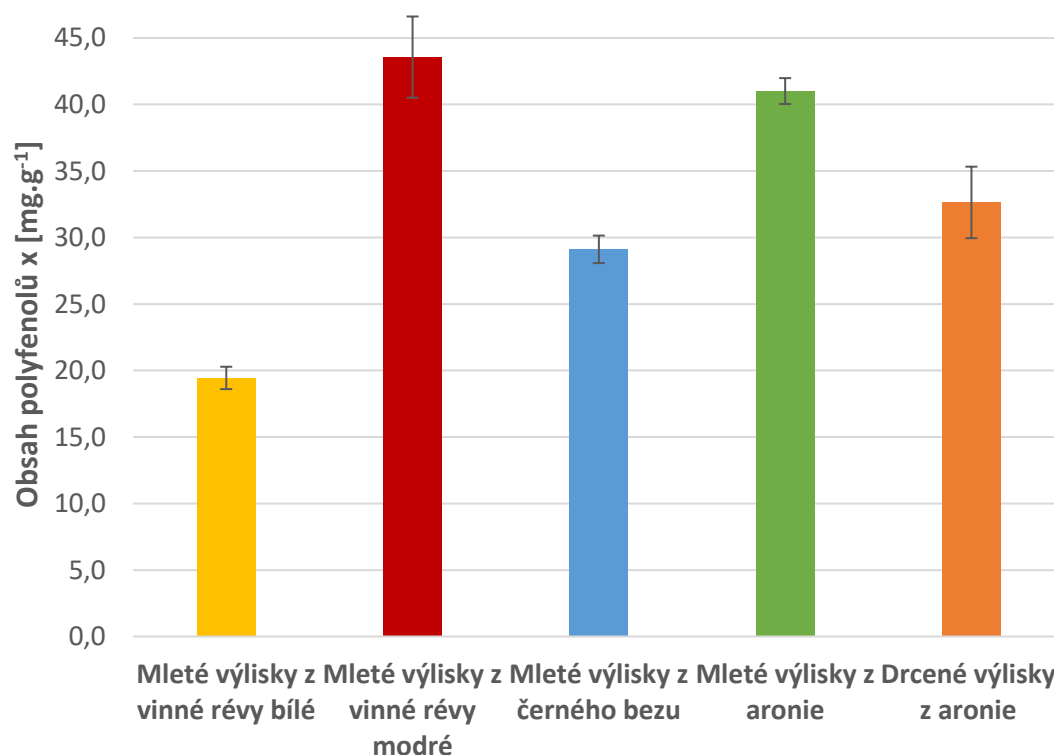
Na základě výše uvedených výsledků byly optimální podmínky extrakce vybraných výlisků simulantem žaludeční šťávy následující: nejvhodnější doba extrakce byla stanovena na 10 minut při laboratorní teplotě.

4.3 Stanovení celkových fenolických látek v připravených extraktech

Po definování optimálních podmínek extrakce byly ještě jednou extrahovány vybrané výlisky ve směsi methanol: voda a v simulantu žaludeční šťávy.

4.3.1 Stanovení po extrakci směsí voda-ethanol

Vybrané druhy výlisků byly extrahovány extrakčním činidlem voda : ethanol v poměru 40:60 (V/V) po dobu dvě hodiny. Všechny vzorky byly extrahovány nebo macerovány třikrát a byly v nich stanoveny celkové fenolické látky. Stanovené koncentrace byly přepočítány na sušinu výlisků. Z nalezených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Výsledné obsahy fenolických látek včetně chybových úseček byly zaznamenány do Grafu 6.



Graf 6 Celkový obsah fenolických látek ve vzorcích extrahovaných v optimální směsi voda-ethanol

Analýzou celkového obsahu fenolických látek bylo zjištěno, že jejich největší obsah byl ve výliscích z modrých hroznů. Naopak nejnižší obsah byl stanoven ve výliscích z bílé odrůdy hroznového vína. Obsah fenolů ve výliscích bílého hroznu byl přibližně o polovinu nižší než u červeného, pravděpodobně kvůli nepřítomnosti anthokyanů.

Množství fenolů ve výliscích bílého hroznového vína bylo stanoveno na $19,44 \pm 0,34 \text{ mg.g}^{-1}$. Podle studií byl obsah fenolických látek extrahovaných z matolin určen na $26,3 \pm 0,4 \text{ mg.g}^{-1}$. Jiná studie při použití odlišného extrakčního postupu stanovila celkové množství fenolických látek v matolinách na $33 - 75 \text{ mg.g}^{-1}$ [42].

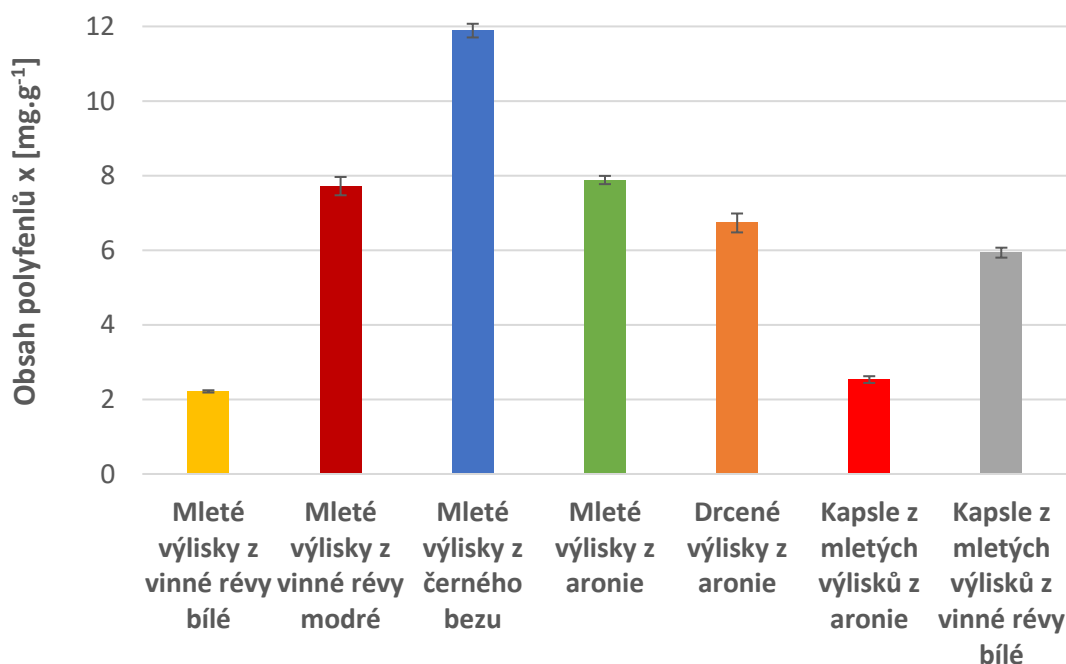
Oproti tomu ve výliscích modrého hroznu byl obsah zjištěn na $43,56 \pm 1,23 \text{ mg.g}^{-1}$. Podle Mazza a spol. se celkový obsah fenolových extraktů získaných ultrazvukovou extrakcí odrůdy Syrah pohyboval od $64,85$ do $117,32 \text{ mg.g}^{-1}$. Porto a spol. zjistil celkový obsah fenolů stejné odrůdy při ultrazvukové extrakci (doba extrakce $4 - 10$ minut, teplota $20 - 80^\circ \text{C}$) mezi $11,20 - 23,36 \text{ mg.g}^{-1}$ [48].

V bezinkách bylo stanoveno množství fenolických látek na $29,11 \pm 0,42 \text{ mg.g}^{-1}$, ve studiích obsahovaly $19,50 \text{ mg.g}^{-1}$ [49].

Výlisky z aronie (mleté, drcené) obsahovaly $32,64 \pm 0,39 \text{ mg.g}^{-1}$ a $41,01 \pm 1,08 \text{ mg.g}^{-1}$. Dle studií byl celkový obsah fenolů v bobulích aronie v rozmezí $34,40 - 37,60 \text{ mg.g}^{-1}$ [2].

4.3.2 Stanovení po extrakci syntetickou žaludeční šťávou

Vybrané druhy výlisků byly také extrahovány simulantom žaludeční šťávy po dobu 10 minut. Všechny vzorky byly extrahovány třikrát a byly v nich stanoveny celkové fenolické látky. Stanovené koncentrace byly přepočítány na sušinu výlisků. Z nalezených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Výsledné obsahy fenolických látek včetně chybových úseček byly zaznamenány do Grafu 7.



Graf 7 Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích extrahovaných v žaludeční šťávě

V simulantu žaludeční šťávy se nejlépe extrahovaly výlisky černého bezu a naopak nejhůře výlisky bílého vína. Z kapslí se nejúčinněji extrahovala kapsle s mletými výlisky z bílého vína, která se dokonce extrahovala lépe než samotné výlisky bílého vína.

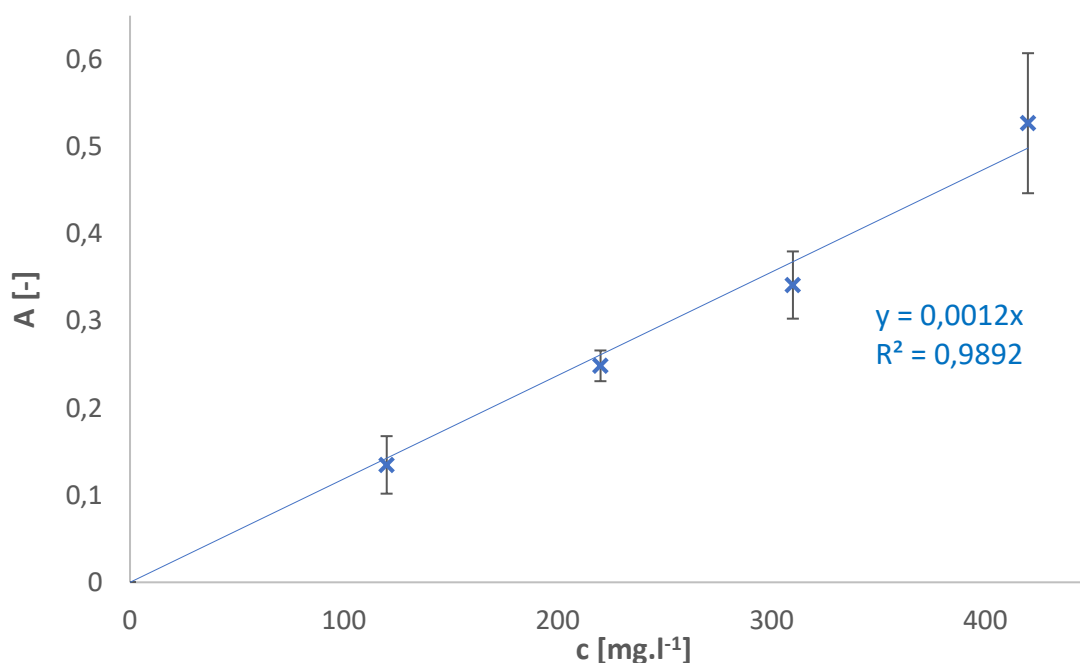
V extraktu z výlisků bílého hroznového vína bylo stanoveno množství fenolů na $2,21 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$. Oproti tomu v extraktu z výlisků červeného hroznového vína byl obsah stanoven na $7,72 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$. Černý bez obsahoval $11,89 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ fenolů a vzorky z aronie (mleté, drcené) obsahovaly $6,73 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ a $7,88 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$. Množství fenolických látek v kapslích z výlisků bílého vína bylo stanoveno na $5,93 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$, zatímco v aroniových kapslích $2,53 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$.

4.4 Stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů instrumentálními technikami

Celková antioxidační aktivita extraktů, připravených optimálním postupem z vybraných ovocných výlisků, byla stanovena jednak spektrofotometricky a také elektronovou paramagnetickou rezonancí. Pro obě stanovení bylo použito totožné ředění a pro obě metody byl použit radikál ABTS•+.

4.4.1 Sestrojení kalibrační závislosti Troloxu

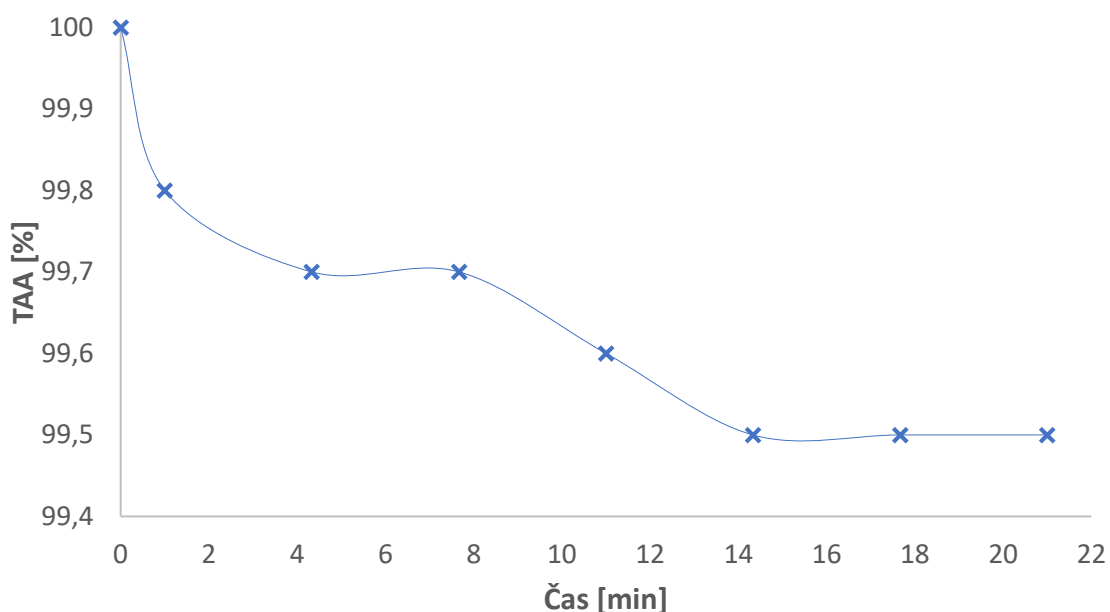
Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační křivka Troloxu. Standard Trolox byl rozpuštěn v 60% ethanolu, byly připraveny 4 jeho standardní roztoky a byla změřena jeho kalibrační závislost. Výsledky byly vztaženy na ekvivalentní množství Troloxu, jednotka TEAC. Kalibrační křivka Troloxu je uvedena v následujícím Grafu 8.



Graf 8 Kalibrační křivka Troloxu

4.4.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity metodou EPR

Ke stanovení antioxidační aktivity touto technikou byl použit radikál ABTS•+, který je velmi reaktivní. Proto bylo nutné před každým měřením na EPR zjistit jeho stabilitu. Příklad krátké stabilitní studie radikálu ABTS•+ je uveden níže v Grafu 9.



Graf 9 Stabilita radikálu ABTS

Z uvedeného grafu vyplývá, že během zhruba 21 minut došlo k poklesu stability radikálu o 0,5 %, což je ideální pro měření. Pokles by měl být maximálně 5 %.

Tabulka 4 Ředění vzorků

Vzorek	Ředění
Mleté výlisky z černého bezu	300 krát
Mleté výlisky z modrého hroznu	400 krát
Mleté výlisky z bílého hroznu	200 krát
Drcené výlisky z aronie	800 krát
Mleté výlisky z aronie	400 krát
Tabletky z mletých výlisků bílého hroznu	-
Tabletky z mletých výlisků aronie	-

Antioxidační aktivita připravených extraktů byla měřena postupem uvedeným v kapitole 3.6.1. Analyzované vzorky byly změřeny jednou. Byl sledován průběh poklesu antioxidační aktivity. U metody EPR lze pozorovat ustálení do konstantní hodnoty antioxidační aktivity, tudíž ustálení radikálové reakce. Výsledky byly porovnány s celkovou antioxidační aktivitou

změřenou na spektrofotometru a byly vyneseny do Grafů 13 až 19, které jsou uvedeny v příloze.

V případě extraktu z výlisků bílého hrozu, zředěného 200krát, byla celková antioxidační aktivita stanovena na 8,9 % za 25 minut, u extraktu z výlisků modrých hroznů, zředěného 400krát, byl pokles o 26,9 % za 18 minut. Z toho vyplývá, že v červené odrůdě révy je více antioxidantů, které by zhasely radikál.

Extrakt z výlisků černého bezu, který byl zředěn 300krát, vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu, už ve druhé minutě byl o 22 %, ve 25 minutě byl pokles o 91,3 %.

Vzorek černého bezu byl jeden z nejtmavších, tudíž obsahoval pravděpodobně větší množství anthokyanů.

Vzorky aronie, které byly pouze drcené a zředěné 800krát, jejich úbytek byl určen o 7,2 % za 18 minut. Extrakt z mleté aronie byl zředěn 400krát a úbytek byl o 5,6 % taktéž za 18 minut. Ve vzorku drcené aronie, bylo pravděpodobně více polyfenolů, jelikož pomletím aronie mohlo dojít k oxidační degradaci polyfenolů a tím u mleté aronie se snížil obsah polyfenolů.

Extrakt z kapslí z výlisků bílého hrozu měl pravděpodobně méně antioxidantů, jelikož celková antioxidační aktivita byla stanovena na 2,7 % za 18 minut. Oproti tomu u kapslí z aronie byla zjištěna na 11,8 % za 26 minut.

4.4.3 Spektrofotometricky pomocí radikálu ABTS•+

Připravené vzorky byly analyzovány třikrát a z výsledků měření byla vypočítána směrodatná odchylka. Naměřené hodnoty byly zaznamenány do grafů (viz přílohy). U extraktů z vybraných ovocných výlisků, připravených optimalizovaným postupem, byly pro srovnání stanoveny také antioxidační aktivity spektrofotometricky s radikálem ABTS•+

Byla změřena absorbance a ta byla přepočtena na procentuální pokles antioxidační aktivity v průběhu analýzy. Připravené vzorky byly analyzovány třikrát a z výsledků měření byla vypočítána směrodatná odchylka. Naměřené hodnoty byly zaznamenány do Grafů 11 až 17, které jsou uvedeny v příloze.

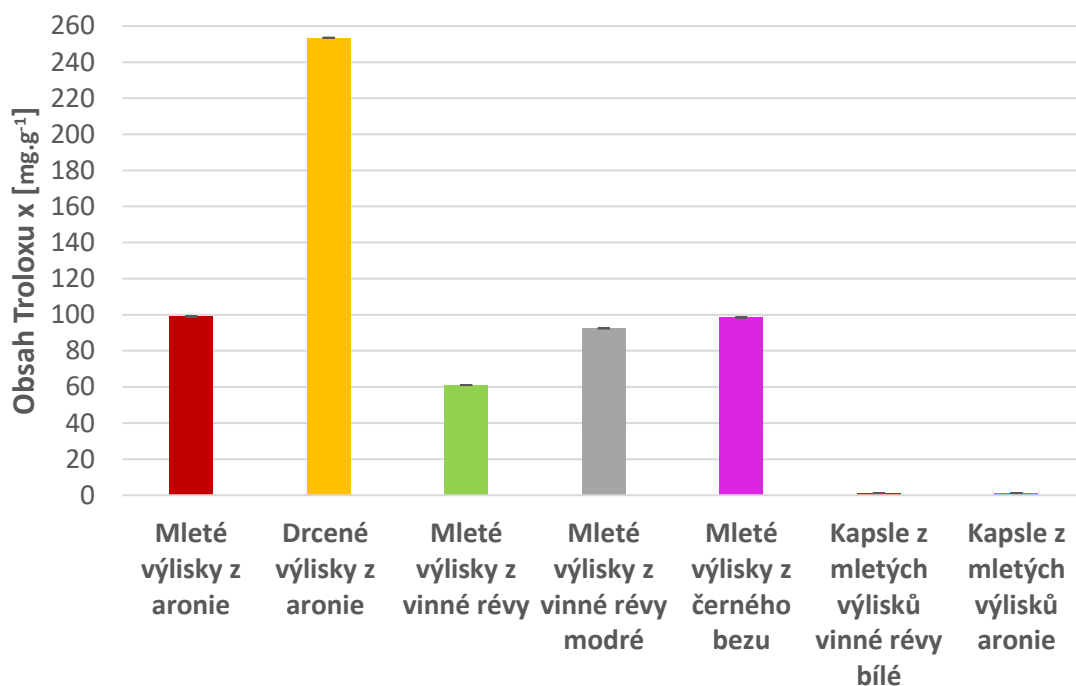
Spektrofotometrická metoda byla méně citlivá než metoda EPR, což lze vidět z výše uvedených Grafů 11 – 17. U spektrofotometru byl zaznamenán minimální pokles TAA ve více zředěných vzorcích. V případě kapslí z výlisků bílého vína byl průběh obou metod podobný, jelikož tyto extrakty se nijak neředily a také pravděpodobně kvůli větší citlivosti EPR na červené vzorky.

K největšímu poklesu celkové antioxidační aktivity, v případě spektrofotometru a průběhu 15 minut, došlo u černého bezu, kdy byl stanoven pokles přibližně o 4,5 %. Naopak k nejnižšímu poklesu došlo u obou kapslí, přibližně o 2,5 %. U ostatních vzorků se pohybovala TAA okolo 4 – 4,5 %.

4.4.3.1 Metoda TEAC

TAA pomocí metody TEAC byla vyhodnocena jako ekvivalent definovaného množství Troloxu. Výsledky z měření jsou zaznamenány do Grafů č. 18 – 24, které jsou uvedeny v příloze. V grafech lze vidět růst obsahu Troloxu v jednotlivých vzorcích. Rovněž byl do Grafu č.12 zaznamenán pokles TAA během měření.

Nejvyšší celkovou antioxidační aktivitu vykazovala drcená aronie a hodnota odpovídala $253,50 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$, zatímco nejnižší byla stanovena v extraktu z bílého hroznu na $61,05 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$. U mleté aronie $99,4 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$, u modré odrůdy vinné révy $92,51 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$. TAA bezu byla stanovena na $98,52 \pm 0,002 \text{ mg.g}^{-1}$. U tabletek byl stanoven $1,12 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ (aronie), $1,10 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ (bílý hrozen).



Graf 10 Pokles obsahu TAA v jednotlivých extraktech za časový interval 15 minut vztahovaný na ekvivalentní množství Troloxu

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jakou vykazují vyrobené kapsle celkovou antioxidační aktivitu a jaké množství polyfenolů je obsažené v extraktech z kapslí, extrahovaných simulantom žaludeční šťávy. Rovněž bylo cílem práce zjistit celkový obsah fenolických látek v extraktech výlisků vybraného ovoce extrahovaných směsí voda – ethanol nebo syntetickou žaludeční šťávou, a porovnat účinnost těchto rozpouštědel. Dalším úkolem bylo porovnat TAA extraktů výlisků vybraného ovoce pomocí metod TEAC a EPR.

V dnešní době fenolické sloučeniny patří mezi nejvýznamnější antioxidanty. Výlisky jsou bohaté na polyfenoly, což bylo prokázáno ve velkém množství studií a taktéž v této bakalářské práci. Velký vliv na obsah polyfenolů má volba rozpouštědla, pH, doba extrakce, úprava vzorku (pomletí), což lze také vidět v této práci. Vzorky se lépe extrahovaly ve směsi voda – ethanol než v uměle připravené žaludeční šťávě. V případě extrakce do směsi rozpouštědel byla nejvhodnější doba dvě hodiny, platilo tvrzení, že s rostoucí dobou extrakce roste obsah polyfenolů. Toto tvrzení neplatilo pro extrakci v umělé žaludeční šťávě, jelikož nejspíše při delší extrakci docházelo k degradaci polyfenolů. Vliv na obsah fenolických látek má i odrůda, kdy obsah polyfenolů v matolinách červeného hroznového vína, extrahovaných ve směsi voda – ethanol, byl stanoven na $43,56 \pm 1,23 \text{ mg.g}^{-1}$, kdežto u matolin z bílého hroznů na $19,44 \pm 0,34 \text{ mg.g}^{-1}$.

Antioxidanty obsažené ve vybraném ovoci vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu. Bylo prokázáno, že metoda EPR je citlivější metodou pro velmi zředěné roztoky než metoda TEAC. Vliv na množství antioxidantů má i úprava vzorku, což můžeme vidět u poklesu TAA měřené pomocí EPR, kdy u vzorku drcené aronie, ředěné 800 krát, byl pokles vyšší (o 7,2 % za 18 minut) než u aronie mleté (o 5,6 % za 18 minut), která byla ředěná 400 krát. Pomletím aronie mohlo dojít k oxidační degradaci antioxidantů, čímž se snížil jejich obsah. Menší TAA u mleté aronie bylo taktéž stanoveno pomocí metody TEAC.

Kapsle měly ve většině případů nižší hodnoty obsahu fenolů oproti sytkým vzorkům. Množství fenolických látek v kapslích z výlisků bílého hroznů bylo určeno na $5,93 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$, v aroniových kapslích bylo $2,53 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$. Pokles antioxidační aktivity, měřené pomocí EPR, u extraktu z kapslí z výlisků bílého hroznů byl o 2,7 % za 18 minut. Oproti tomu u kapslí z aronie byl zjištěn o 11,8 % za 26 minut. Nižší obsahy mohou být způsobeny neúplnou extrakcí, jelikož pro stanovení pomocí EPR a TEAC, byly vzorky extrahovány ve směsi voda – ethanol po dobu dvou hodin. Jelikož nebylo zvolené prostředí kyselé, nedošlo k úplnému rozpuštění kapsle a tedy i jejího obsahu. Pomocí metody TEAC byl pokles u obou tabletek přibližně o 2,5 %.

Výsledky této práce potvrzují, že vyrobené kapsle obsahují nemalé množství polyfenolů a mohou se tedy použít jako doplněk stravy.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ROUSSEAU, Kyle. Method Development for the Analysis of Anthocyanins in Aronio Berries via HPLC. *Honors College*. 2014, Paper 176.
- [2] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica*. 2008, 74(13), 1625-1634. DOI: 10.1055/s-0028-1088306. ISSN 0032-0943. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088306>
- [3] OCHMIAN, Ireneusz Dariusz, Jozef GRAJKOWSKI a Milosz SMOLIK. Comparison of Some Morphological Features, Quality and Chemical Content of Four Cultivars of Chokeberry Fruits (*Aronia melanocarpa*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2012, 40(1), 253-260. DOI: 10.15835/nbha4017181. ISSN 1842-4309. Dostupné také z: <http://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/7181>
- [4] In: FRESH-JUICES [online]. [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <http://fresh-juices.cz/clanky/aronie-cerna-jerabina>
- [5] NOSRETI, Darius. ARONIE, JEŘÁB (JEŘABINA): Aronie. Darius [online]. 2001, 2005 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: http://www.darius.cz/archeus/B_aronie.html
- [6] ŠTUMAROVÁ, K. Aronie – zdroj biologicky aktivních látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2017. 37 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D
- [7] GOUVINHAS, Irene, Rafaela A. SANTOS, Marcelo QUEIROZ, Carla LEAL, Maria José SAAVEDRA, Raúl DOMÍNGUEZ-PERLES, Miguel RODRIGUES a Ana I.R.N.A BARROS. Monitoring the antioxidant and antimicrobial power of grape (*Vitis vinifera* L.) stems phenolics over long-term storage. *Industrial Crops and Products*. 2018, **126**, 83-91. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.10.006. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018308690>
- [8] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.C
- [9] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [10] EVINICE [online]. [cit. 2019-03-17]. Dostupné z: <http://www.evinice.cz/o-vine/vinna-reva>
- [11] KRAUS, Vilém a Vilém KRAUS. *Pěstujeme révu vinnou: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 2003. Česká zahrada. ISBN 80-247-0562-1.
- [12] PAVLOUŠEK, Pavel a Vilém KRAUS. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 2009. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-2787-5.

- [13] In: ReceptyOnline [online]. [cit. 2019-03-17]. Dostupné z: <https://www.receptyonline.cz/vinna-reva/>
- [14] PAVLOUŠEK, Pavel a Vilém KRAUS. *Výroba vína u malovinářů: moderní vinohradnictví*. 2., aktualiz. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2010. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [15] VRCHOTOVÁ, N. Barva červených vín. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Fakulta agronomická, Ústav Technologie potravin, 2011. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Viera Šottníková, Ph.D.
- [16] ITIS [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <https://www.itis.gov/>
- [17] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 80-701-3435-6
- [18] SÓJKA, M., KOŁODZIEJCZYK, K., MILALA, J. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 51, pp. 77-86.
- [19] QUEIROZ, Marcelo, David OPPOLZER, Irene GOUVINHAS, Amélia M. SILVA, Ana I.R.N.A. BARROS a Raúl DOMÍNGUEZ-PERLES. New grape stems' isolated phenolic compounds modulate reactive oxygen species, glutathione, and lipid peroxidation in vitro: Combined formulations with vitamins C and E. *Fitoterapia*. 2017, **120**, 146-157. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.06.010. ISSN 0367326X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X17307566>
- [20] KESKIN, Nurhan, Hasan ÇELİK, Birhan KUNTER a Siddik KESKIN. A study on total phenolics and vitamin C contents of Kalecik Karasi (*Vitis vinifera* L.) clones. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* [online]. 2014, 2014, (51), 131-135 [cit. 2019-04-16]. ISSN 2076-0906. Dostupné z: <http://www.pakjas.com.pk>
- [21] KRISTBERGSSON, Kristberg. *Functional properties of traditional foods*. New York, NY: Springer Science Business Media, 2015. ISBN 978-1-4899-7660-4.
- [22] DHINGRA, Devinder, Mona MICHAEL, Hradesh RAJPUT a R. T. PATIL. Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2012, **49**(3), 255-266 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1007/s13197-011-0365-5. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0365-5>
- [23] LLOBERA, Antonia a Jaime CAÑELLAS. *Antioxidant activity and dietary fibre of Prensal Blanc white grape (Vitis vinifera) by-products* [online]. 2008, **43**(11), 1953-1959 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01798.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2008.01798.x>
- [24] LLOBERA, Antonia a Jaime CAÑELLAS. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* [online]. 2007, **101**(2), 659-666 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.02.025. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606001361>

- [25] MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, Christian RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2004, **79**(5), 727-747 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1093/ajcn/79.5.727. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/79/5/727/4690182>
- [26] *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, **2**(5) [cit. 2019-04-16]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2009/897484/>
- [27] MUDNIC, Ivana, Darko MODUN, Vesna RASTIJA, et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine: food sources and bioavailability. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(3), 1205-1210 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.038. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609010310>
- [28] Web.vscht [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf> [online]. [cit. 2019-04-16].
- [29] POKORNÝ, Jan, Nedyalka YANISHLIEVA a Michael GORDON. Antioxidants in food: practical applications. Repr. Boca Raton FL: CRC Press, 2001. ISBN 1 85573 463 X
- [30] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179
- [31] KOPŘIVA, Vladimír. *Antioxidační kapacita potravin* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C8N%C D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>
- [32] DEMIRCI, Mehmet Ali, Yaşar, Fatih GUL, Tevfik OZEN a Ibrahim DEMIRTAS. Extraction, isolation of heat-resistance phenolic compounds, antioxidant properties, characterization and purification of 5-hydroxymaltol from Turkish apple pulps. *Food Chemistry* [online]. 2018, **269** [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.147. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618311324>
- [33] HANDOUSSA, Heba, Walid ABDALLAH a Mona ABDELMOHSEN. UPLC–ESI–PDA–MSn profiling of phenolics involved in biological activities of the medicinal plant *Halocnemum strobilaceum* (Pall.). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2019, 422-429 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.22037/IJPR.2019.2356. Dostupné z: http://ijpr.sbmu.ac.ir/article_2356_0.html
- [34] PLÁTENÍK, Jan. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, 2009, (1), 30-33 [cit. 2019-04-12] Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int2009010006Volne_radikaly_antioxidanty_a_starnuti.php
- [35] KOLEČKÁŘ, V., E. BROJEROVÁ, L. OPLETAL, D. JUND a K. KUČAK. *Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii*

- yperitem navozených poškození* [online]. 2007, 73-76 [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://www.co-allergy.cz/coaci-clanek/antioxidanty-volne-radikaly-mechanismus-pusobeni-a-vyuziti-pri-terapii-yperitem-navozenych-poskozeni-3199>
- [36] Is.mendelu [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52974
- [37] RÉBLOVÁ, Zuzana. VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA AKTIVITU ANTIOXIDANTŮ. *Chemické listy*. 2011, č.105, s. 667-673. ISSN 0009-2770.
- [38] ŘEHÁKOVÁ, Z., Vyhledávání biologicky aktivních rostlinných sekundárních metabolitů testy antioxidační a antiagregační. Hradec Králové, Farmaceutická fakulta, 2009. 13 s. Disertační práce, školitel prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.
- [39] ZLOCH, Z., J. ČELAKOVSKÝ a A. AUJEZDSKÁ. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Plzeň, 2004
- [40] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *PRAKTIKUM Z BIOCHEMIE-Pracovní sešit*. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, inovace, 2016. s.25
- [41] KEDARE, Sagar B. a R. P. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, **48**(4), 412-422. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0251-1>
- [42] BRUKER [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/404.html>
- [43] CVINER, Petr, Karolína PÁDROVÁ a Irena KOLOUCHOVÁ. MODERNÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUROVIN ZE ZPRACOVÁNÍ VINNÝCH HROZNŮ. *Chemické listy*. 2017, (111), 103-108.
- [44] SEDLÁČEK, Milan. ZNALECVIN [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz/matoliny/>
- [45] Is.mendelu [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=72628
- [46] GRUNOVAITĖ, Lina, Milda PUKALSKIENĖ, Audrius PUKALSKAS a VENSKUTONIS. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of Functional Foods* [online]. 2016, **24**, 85-96 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.jff.2016.03.018. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461630038X>
- [47] NACZK, Marian, Fereidoon SHAHIDI, Luzimar S. M. DO NASCIMENTO, Ronoel L. O. GODOY, Erika F. SOUZA, Ana Iraidy S. BRÍGIDA, Renata G. BORGUINI a Renata V. TONON. Extraction and analysis of phenolics in food: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1054**(1-2), 95-111. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.059. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014098>

- [48] MAZZA, Karen E. L., Manuela C. P. A. SANTIAGO, Luzimar S. M. DO NASCIMENTO, Ronoel L. O. GODOY, Erika F. SOUZA, Ana Iraidy S. BRÍGIDA, Renata G. BORGUINI a Renata V. TONON. Syrah grape skin valorisation using ultrasound-assisted extraction: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. *Journal of Chromatography A*. 2018, **54**(3), 641-650. DOI: 10.1111/ijfs.13883. ISSN 09505423. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.13883>
- [49] Phenol-Explorer [online]. [cit. 2019-05-5]. Dostupné z: <http://phenolexplorer.eu/contents/food/124>

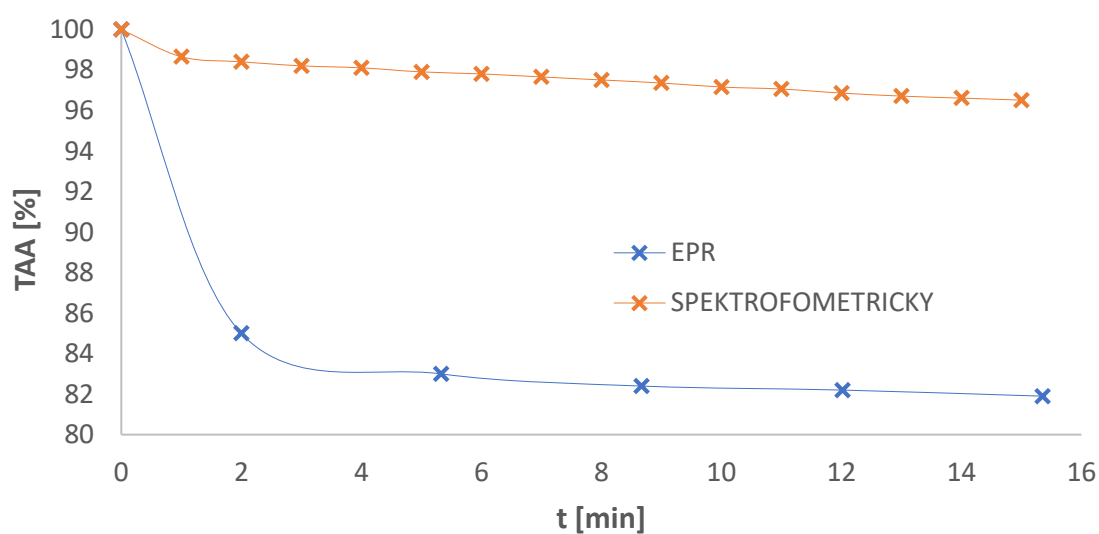
7. SEZNAM ZKRATEK

DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
ABTS	diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazolin)-6-sulfonové kyseliny)
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
AAPH	2,2'azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
DMPO	2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxidu
LDL	low-density lipoproteins
MDA	malondialdehydu
TBA	thiobarbiturová kyselina
FRAP	ferric reducing antioxidant potential
Fe ³⁺ -TPTZ	Fe ³⁺ -2,4,6- -tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)

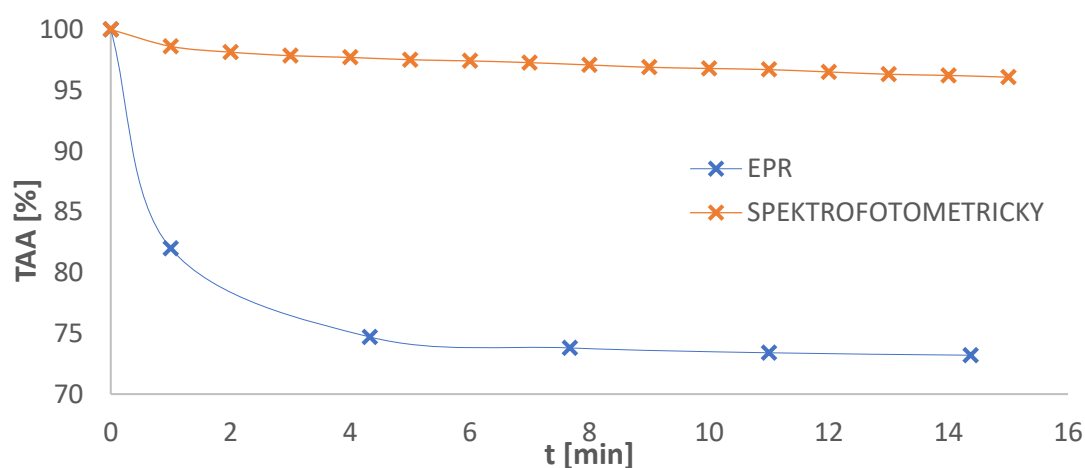
8. PŘÍLOHY

Tabulka 5 Výsledné hodnoty sušiny a obsahu vody

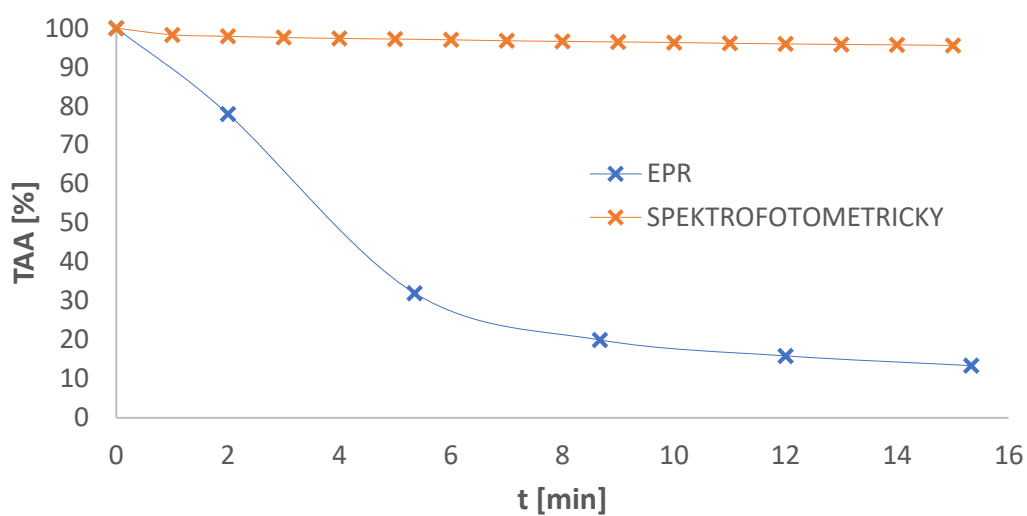
	40		105	
	Obsah sušiny [%]	Obsah vody [%]	Obsah sušiny [%]	Obsah vody [%]
Výlisky z bílého hroznového vína	93,48	6,52	91,84	8,16
Výlisky z červeného hroznové víno	99,57	0,43	96,50	3,50
Výlisky z černého bezu	99,81	0,19	95,22	4,78



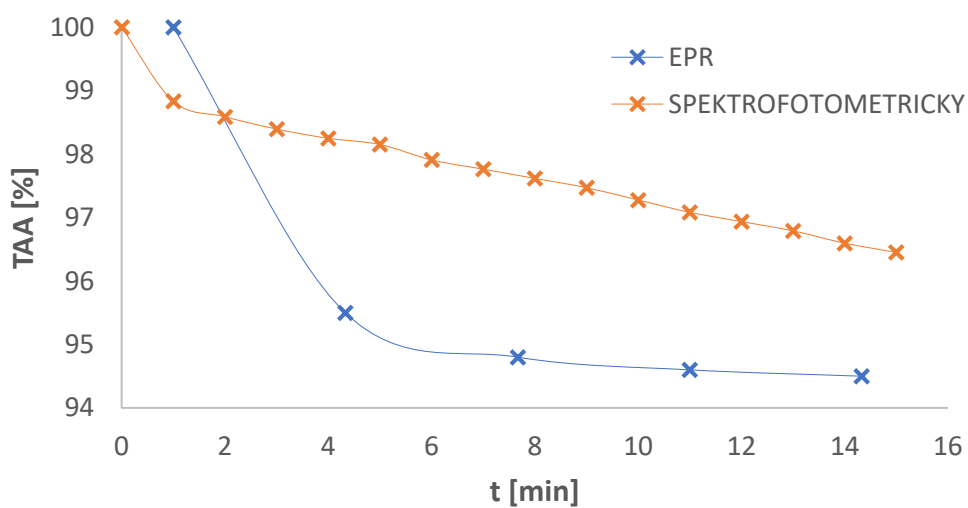
Graf 11 TAA pomletých výlisků z bílého hroznů



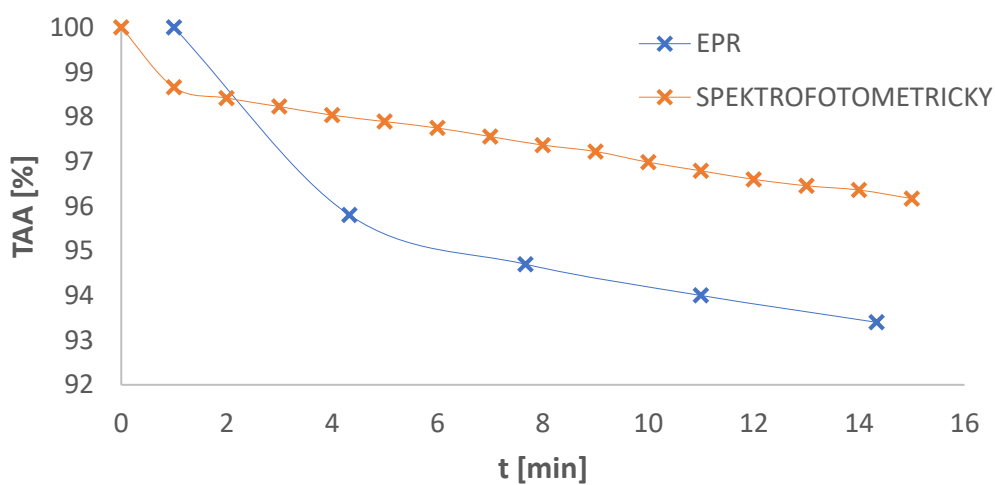
Graf 12 TAA pomletých výlisků z červeného hroznů



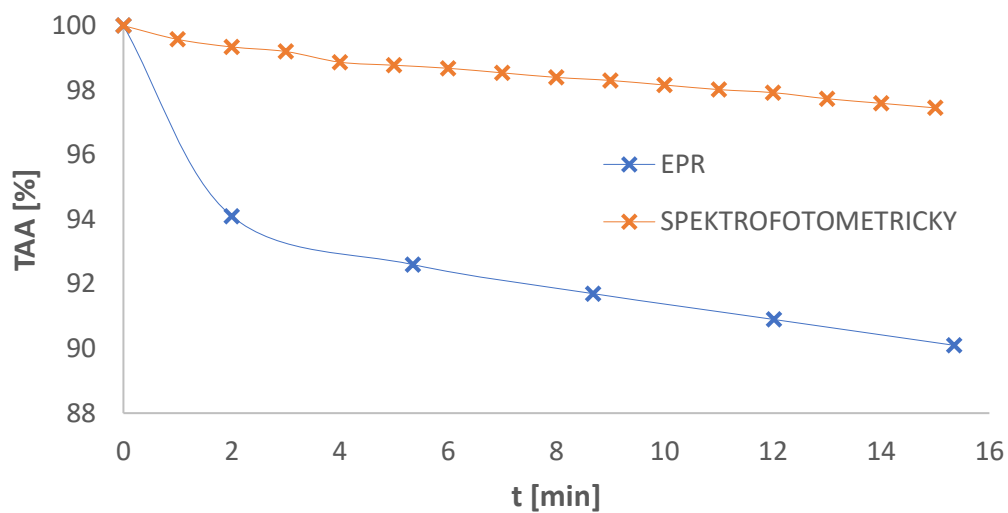
Graf 13 TAA pomletých výlisků z černého bezu



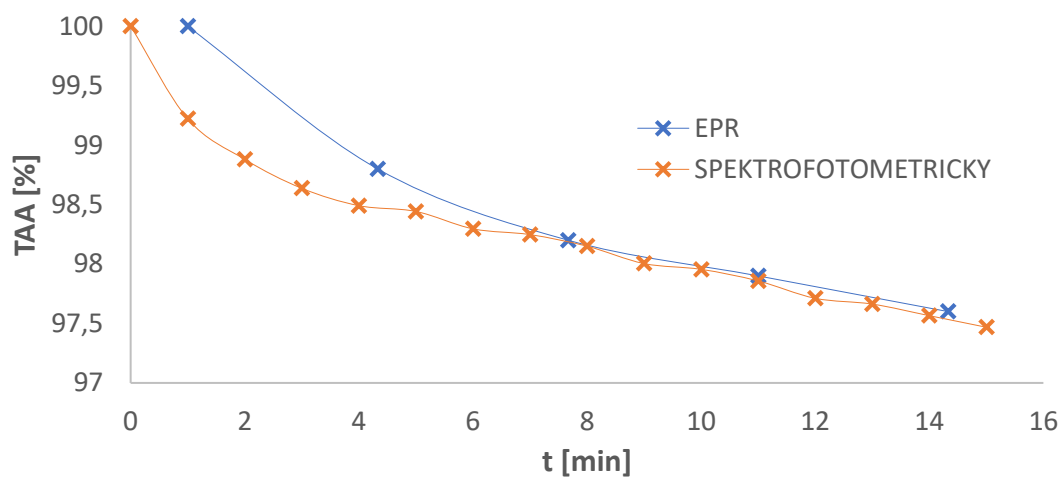
Graf 14 TAA pomletých výlisků aronie



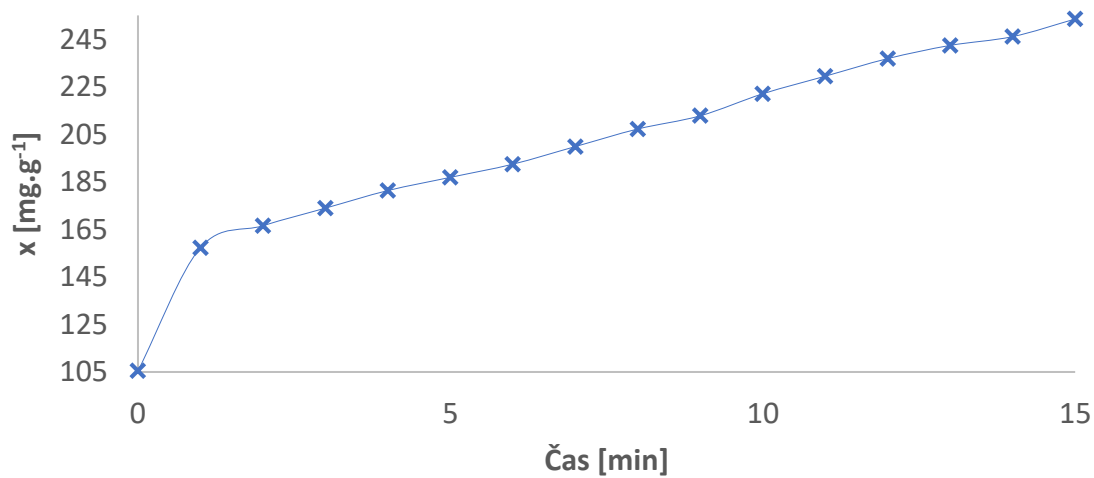
Graf 15 TAA drcených výlisků aronie



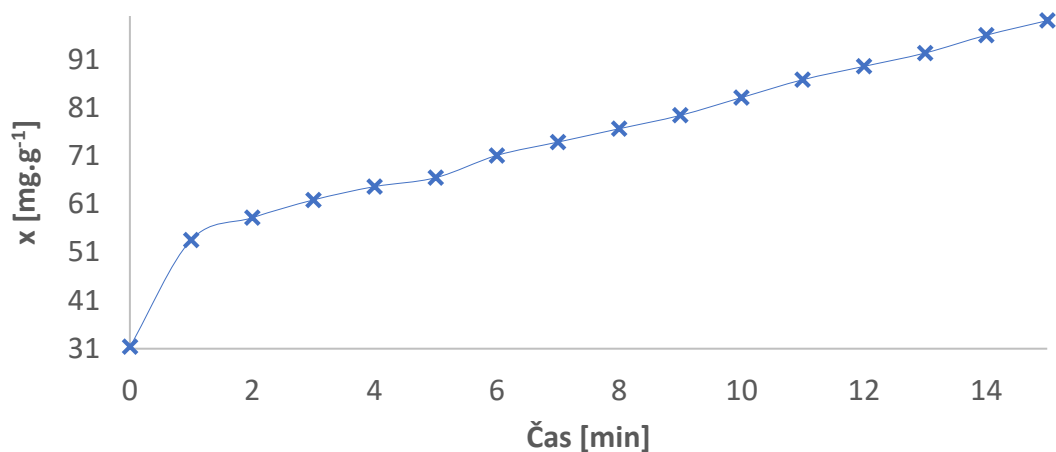
Graf 16 TAA kapslí z pomletých výlisků aronie



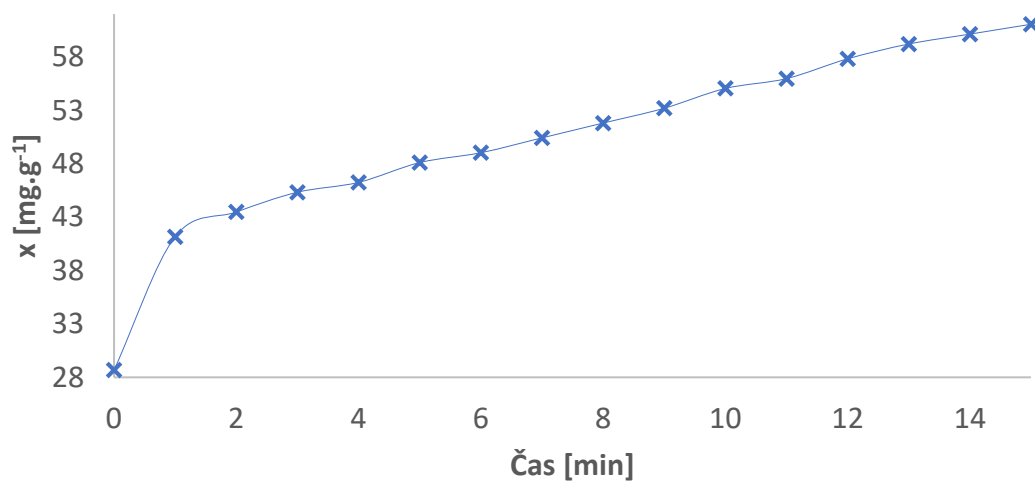
Graf 17 TAA kapslí z pomletých výlisků bílého hroznů



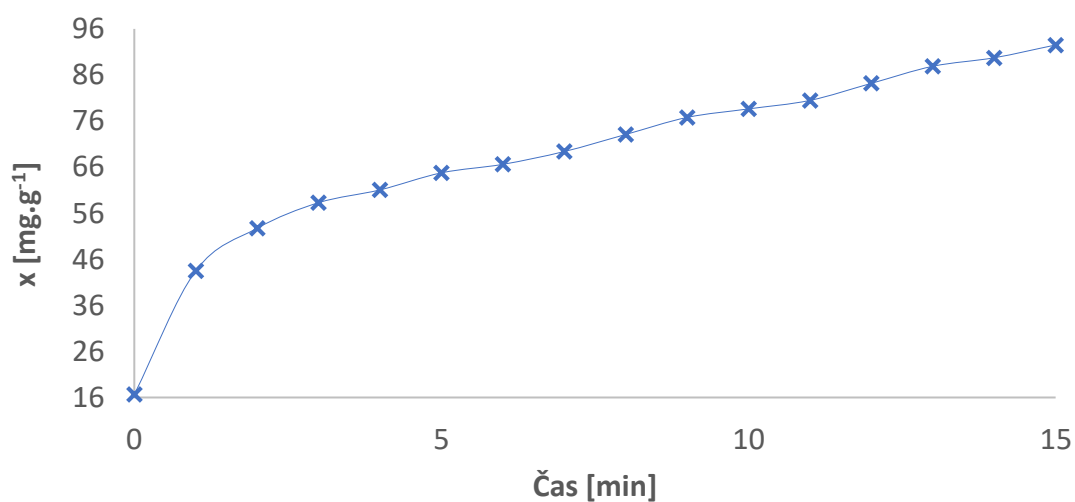
Graf 18 TAA (Trolox) drcených výlisků z aronie



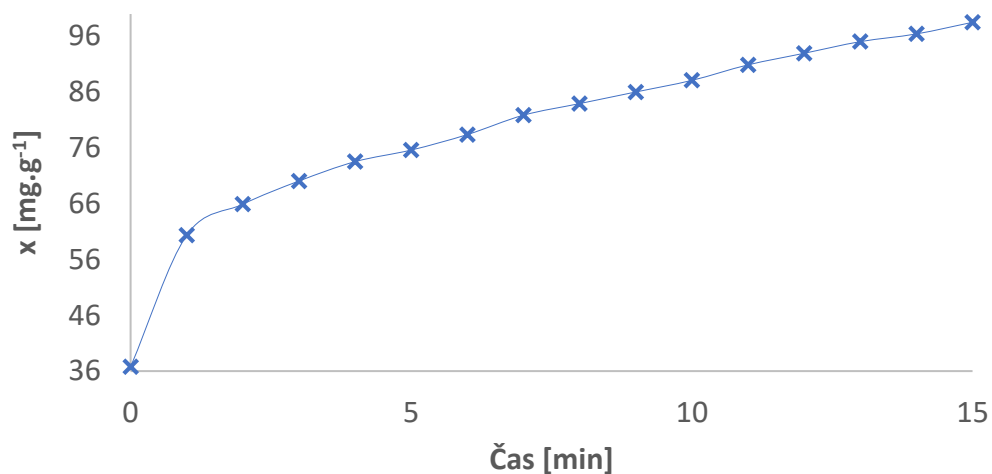
Graf 19 TAA (Trolox) pomletých výlisků z aronie



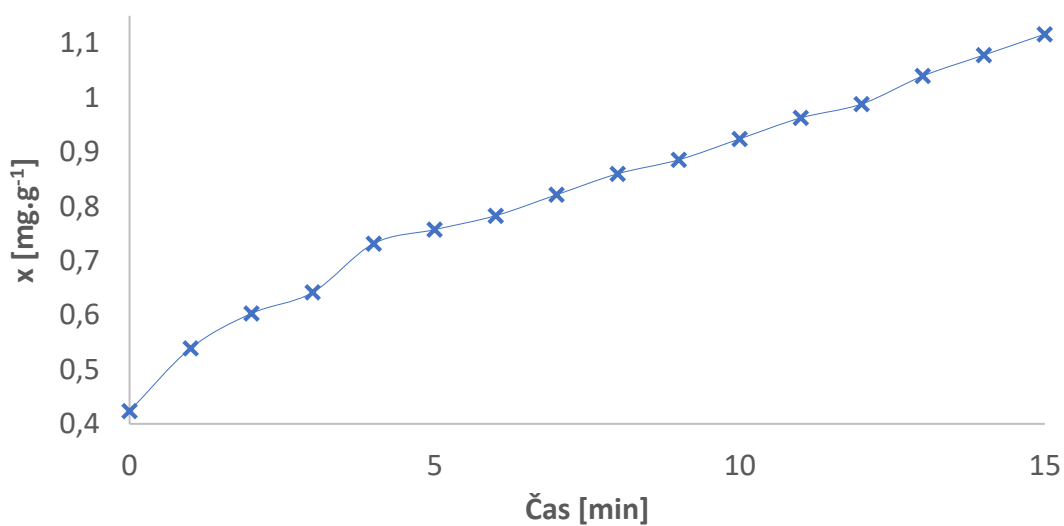
Graf 20 TAA (Trolox) pomletých výlisků z bílého hroznů



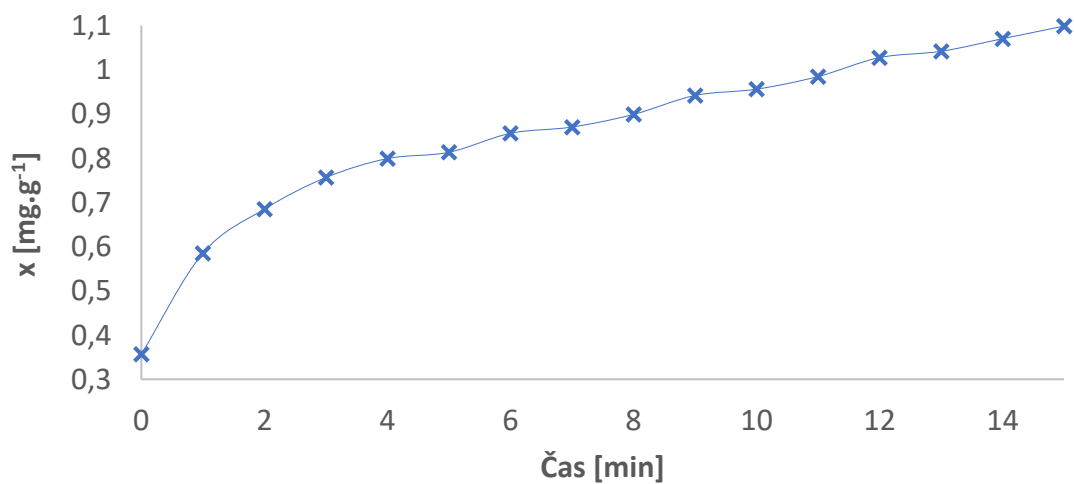
Graf 21 TAA (Trolox) pomletých výlisků z červeného hroznů



Graf 22 TAA (Trolox) pomletých výlisků z černého bezu



Graf 23 TAA (Trolox) kapslí z pomletých výlisků aronie



Graf 24 TAA (Trolox) kapslí z pomletých výlisků bílého hroznů